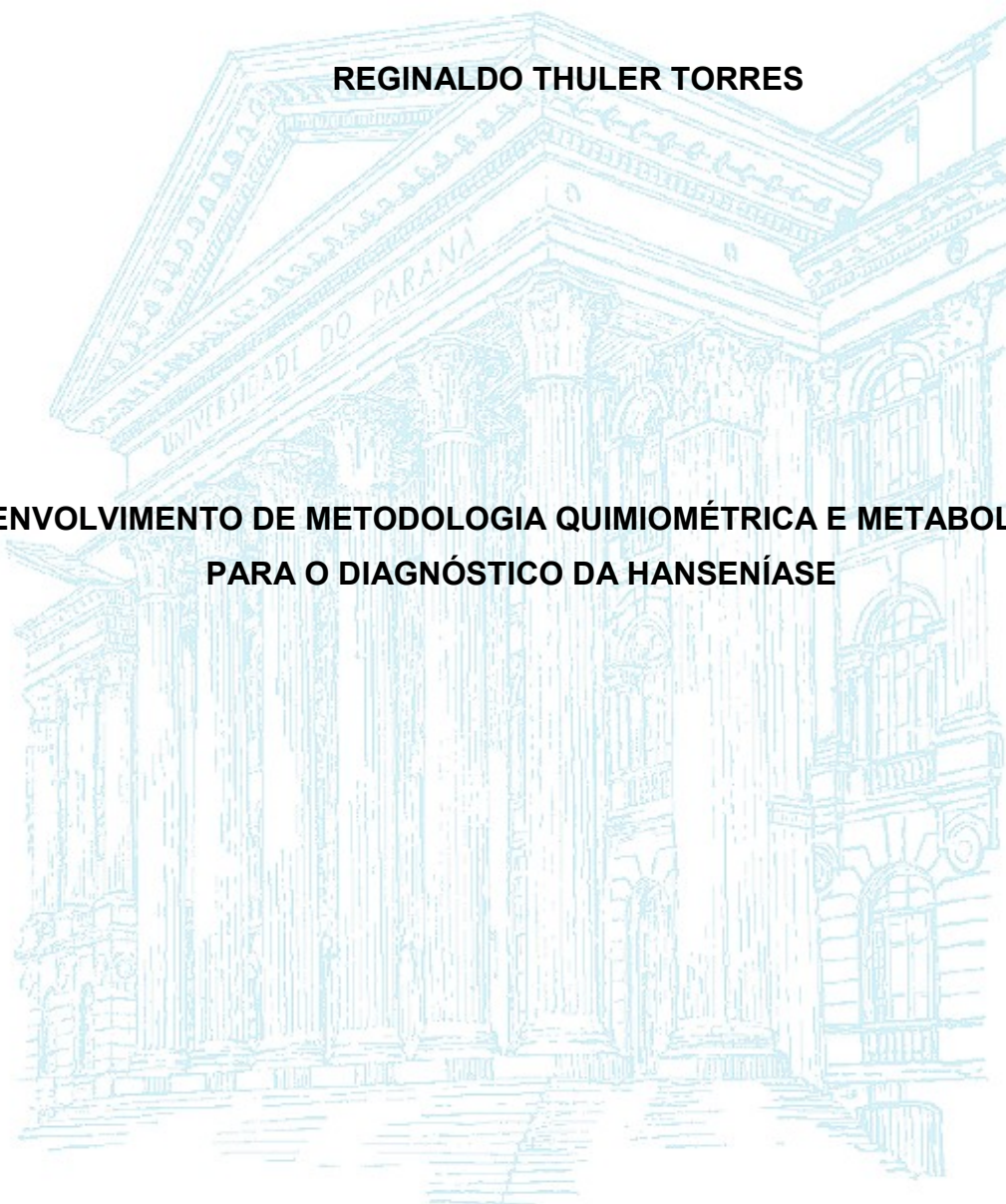


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINALDO THULER TORRES

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA QUIMIOMÉTRICA E METABOLÔMICA
PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE**



CURITIBA

2017

REGINALDO THULER TORRES

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA QUIMIOMÉTRICA E METABOLÔMICA
PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Prof^a Dr.^a Thais Martins Guimarães
de Francisco

CURITIBA

2017

Torres, Reginaldo Thuler

Desenvolvimento de metodologia metabolômica e quimiométrica para o diagnóstico da hanseníase /

Reginaldo

Thuler Torres - Curitiba, 2017.

106 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Professora Dra. Thais Martins Guimarães de Francisco

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde.

Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Metabolômica. 2. Hanseníase. 3. Cromatografia líquida. I. Pontarolo, Roberto. II. Francisco, Thais Martins Guimarães de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.998



TERMO DE APROVAÇÃO

REGINALDO THULER TORRES

Título: "DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador


Profa. Dra. Thais Martins Guimarães de Francisco
Co-orientadora


Prof. Dr. Sérgio Túlio Stinghen
Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI


Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 10 de março de 2017.

Dedico este trabalho a meus pais, a minha esposa Andréa Cristina, a meus filhos Divamaria Giovana e Rafael por estarem sempre a meu lado em todas as circunstâncias.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela oportunidade de vir a esse mundo.

A meus pais por terem me trazido ao mundo compartilhando o dom da vida.

A minha esposa por ter escolhido dividir a sua vida comigo e compreendido e entendido os vários momentos de ausência. Você foi quem deu forças para poder chegar até aqui. Amo-te muito!

A meus filhos Divamaria Giovana e Rafael que sempre me incentivaram a prosseguir nos estudos.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo por aceitar ser meu orientador e ter confiado em meu trabalho. Serei eternamente agradecido. O meu muito obrigado!

A Profa. Dra. Thais Martins Guimarães de Francisco por ter coorientado este trabalho e ter ajudado nos momentos de dificuldade.

A Doutoranda Letícia Bonancio Cerqueira por ter ensinado a utilizar o espectrômetro de massa e por todo aprendizado que me passou. Você foi parte fundamental para desenvolver este projeto.

Ao mestrando Alan pelas dicas de PCA quando eu estava com dificuldades.

A Profa. Dra. Noemi e Prof. Dr. Patrício pelas aulas de PCA e PLS vocês foram muito atenciosos.

A Profa. Dra. Marillis pela ajuda na elaboração da patente.

Aos meus colegas do Centro de Estudos em Biofarmácia por terem cada um contribuído à sua maneira nas conversas informais para o desenvolvimento do trabalho.

"Tente ser uma pessoa de sucesso, mas prioritariamente tente ser uma pessoa de valor".

Albert Einstein

RESUMO

A hanseníase ainda representa um problema de saúde no Brasil e no mundo. Essa doença, causada pelo *Mycobacterium leprae*, afeta principalmente a pele e o sistema nervoso periférico. Atualmente sintomas clínicos são utilizados para o diagnóstico desta patologia, no entanto, os sinais inicialmente evidenciados são inespecíficos para um diagnóstico rápido e confiável. Neste trabalho a técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada com Espectrômetro de Massas de quadrupolo-tempo de voo e ionização por electrospray (UPLC-ESI-qTOF-MS) foi utilizada como uma ferramenta para a classificação de amostras e possibilidade de detecção da hanseníase. O qTOF trabalha com massas exatas, apresentando maior especificidade em relação a outras técnicas de menor resolução e evitando que se obtenha uma resposta falso-positiva. Além disso, apresenta maior número de informação em uma única análise permitindo uma avaliação mais completa das amostras. Para conclusão dos estudos, foram utilizados plasmas de indivíduos portadores das diferentes formas de hanseníase (Tuberculóide, Virchowiana e Dimorfa; n = 45) bem como de indivíduos sadios (controles, n=15). Previamente às análises, foi realizado o pré-tratamento das amostras com acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoroacético para a precipitação das proteínas de alto peso molecular. Após a injeção das amostras no UPLC-ESI-qTOF-MS, os dados adquiridos foram analisados por meio de análises quimiométricas. Com o objetivo de identificar padrões de resposta que pudessem diferenciar os grupos em controle e doentes, foram utilizadas análises quimiométricas. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi capaz de produzir uma adequada classificação das amostras em grupos com hanseníase e controle (sem hanseníase) e além disso, também contribuíram para indicar as m/z responsáveis pela diferenciação dos grupos, ou seja, possíveis biomarcadores para a doença. As $m/z= 756.5551$, $m/z= 774.5659$ e $m/z= 790.5606$ estavam com a intensidade aumentada nos pacientes com hanseníase e a $m/z= 701.5606$ estava com a intensidade diminuída neste grupo. A Análise dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foi utilizada com sucesso para a predição da presença ou ausência da Hanseníase em amostras desconhecidas. O valor do RMSEP foi de 0,032 no grupo Tuberculóide, 0,057 nos Virchowiano, 0,049 no Dimorfo e de 0,11 nos controles. Sendo assim, o método empregado foi considerado sensível, preciso e seletivo em relação a diferenciação das amostras com e sem hanseníase e é apresentado como uma ferramenta para o diagnóstico da mesma, o que possibilita o início do tratamento medicamentoso o mais precocemente possível auxiliando no encerramento do ciclo de transmissão dessa doença.

Palavras-chave: Metabolômica 1. Hanseníase 2. UPLC-ESI-qTOF-MS 3.

ABSTRACT

Leprosy, also known as Hansen's disease, still represents a health problem in Brazil and in the world. This disease results from infection with *Mycobacterium leprae* mainly affecting the skin, peripheral nerves, eyes and mucosa of the upper respiratory tract. Diagnosis of leprosy is most commonly based on the clinical signs and symptoms. However, this initially evidenced signs are non-specific for a rapid and reliable diagnosis. In this work, the classification of samples and the possibility of leprosy detection was investigated using the ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-qTOF-MS) technique and multivariate data analysis (PCA and PLS). To this end, plasma samples of patient with different forms of leprosy (Tuberculoid, Lepromatous and Borderline, n = 45) and healthy individuals (controls, n = 15) were analyzed. Because low molecular weight proteins (LMW), and other small components have been associated with infectious disease, a precipitation method with acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid was used for separation of low molecular weight (LMW) proteins from high abundance and high molecular weight (HMW) proteins in plasma samples. The acetonitrile remaining fractions were analyzed using UPLC-ESI-qTOF-MS. The acquired data were analyzed using multivariate data analysis. Principal component analysis (PCA) provided pattern distinction of control and leprosy plasmas samples and also allowed the visualization of the ions most relevant to group discrimination. Partial Least Squares (PLS) were used successfully to model the data and predict the presence or absence of leprosy in unknown samples (n=18). The method was considered sensitive and selective, once the quadrupole-time-of-flight analyzer (qTOF) detect exact masses, has greater specificity in relation to other techniques of lower resolution avoiding to obtain a false-positive response. In addition, it presents a greater number of information in a single analysis allowing a more complete evaluation of the samples. Therefore, UPLC-ESI-qTOF-MS with multivariate data analysis is a promising technique for diagnosing leprosy patients as soon as possible. Early recognition of leprosy and treatment are key elements to interrupt transmission.

Key-words: Metabolomic 1. Leprosy 2. UPLC-ESI-qTOF-MS 3.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CRÂNIO DO PERÍODO CALCOLÍTICO ENCONTRADO NA ÍNDIA	24
FIGURA 2 - ENVELOPE CELULAR DE <i>M. leprae</i>	34
FIGURA 3 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 10 µL DA SOLUÇÃO DE 200 µL DE PLASMA PRECIPITADO COM 1 ML DE ACETONITRILA/ÁCIDO TRIFLUOROAÉTICO 0,1% (V/V) E RESUSPENDIDO COM 200 µL DE ACETONITRILA/ACIDO FÓRMICO 0,1% (V/V).....	55
FIGURA 4 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 10 µL DA SOLUÇÃO DE 100 µL DE PLASMA PRECIPITADO COM 200 µL DE ACETONITRILA/ÁCIDO TRIFLUOROAÉTICO 0,1% (V/V) E RESUSPENDIDO COM 100 µL DE ACETONITRILA/ACIDO FÓRMICO 0,1% (V/V).....	55
FIGURA 5 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 10 µL DA SOLUÇÃO DE 50 µL DE PLASMA PRECIPITADO COM 200 µL DE ACETONITRILA/ÁCIDO TRIFLUOROAÉTICO 0,1% (V/V) E RESUSPENDIDO COM 50 µL DE ACETONITRILA/ACIDO FÓRMICO 0,1% (V/V).....	56
FIGURA 6 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 5 µL DE PLASMA DE PACIENTE COM HANSENÍASE.....	56
FIGURA 7 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 µL DE PLASMA DE PACIENTE COM HANSENÍASE	57
FIGURA 8 - CROMATOGRAMA OBTIDO NO MODO NEGATIVO A PARTIR DA INJEÇÕES DE 10 µL DE PLASMA.	58
FIGURA 9 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MODO NEGATIVO A PARTIR DAS INJEÇÕES DE 10 µL DE PLASMA.	58
Figura 10 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DA RESUSPENSÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA COM ACETONITRILA/ÁGUA/ÁCIDOFÓRMICO (70:30:0,1) (v/v/v).	59
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 µL DE PLASMA DE UM PACIENTE DO GRUPO TUBERCULÓIDE	60
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 µL DE PLASMA DE UM PACINTE DO GRUPO VIRCHOWIANO	60
FIGURA 13 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 µL DE PLASMA DE UM PACINTE DO GRUPO DIMORFO	61

FIGURA 14 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 µL DE PLASMA DE UM PACINTE DO GRUPO CONTROLE.	61
FIGURA 15 - CROMATOGRAMA 0-9 MIN NORMALIZADO (BASELINE AT ZERO) PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO) E TUBERCULÓIDE (VERDE).	62
FIGURA 16 - CROMATOGRAMA 0-9 MIN NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO) E TUBERCULÓIDE (VERDE) E VIRCHOWIANO (VINHO).	63
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA 0-9 MIN NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO).	63
Figura 18 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 0-4 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO).	64
FIGURA 19- AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 4-6 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO).	65
FIGURA 20 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-9 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO).	65
FIGURA 21 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHORVIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO) DO PRIMEIRO DIA DE EXPERIMENTO.	66
FIGURA 22 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO) DO SEGUNDO DIA DE EXPERIMENTO.	67
FIGURA 23 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA	

CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO) DO TERCEIRO DIA DE EXPERIMENTO.....	67
FIGURA 24 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA COM 45 AMOSTRAS DISTRIBUIDAS ENTRE OS GRUPOS TUBERCULÓIDE (15 AMOSTRAS), VIRCHOWIANO (15 AMOSTRAS) E DIMORFO (15 AMOSTRAS)...	68
FIGURA 25 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA COM 60 AMOSTRAS DISTRIBUIDAS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE (15 AMOSTRAS), TUBERCULÓIDE (15 AMOSTRAS), VIRCHOWIANO (15 AMOSTRAS) E DIMORFO (15 AMOSTRAS).....	69
FIGURA 26 - GRAFICO DE EIGENVALUES.....	72
FIGURA 27 - GRÁFICO DE SCORES DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS PACIENTES SADIOS E COM DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE.....	74
FIGURA 28 - GRÁFICO DE LOADINGS DOS GRUPOS.....	76
FIGURA 29 - O GRÁFICO DA RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DA VALIDAÇÃO CRUZADA (RMSECV) VERSUS NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (VL).....	77
FIGURA 30 - GRÁFICO DE LEVERAGE VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS DA MATRIZ DE CALIBRAÇÃO.....	78
FIGURA 31 - GRÁFICO DE LEVERAGE VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS DA MATRIZ DE CALIBRAÇÃO SEM AS AMOSTRAS 13 E 14.....	79
FIGURA 32 - GRÁFICO DOS VALORES MEDIDOS VERSUS VALORES PREDITOS PLOTADO PARA VERIFICAR A CAPACIDADE DE PREDIÇÃO DAS PRÓPRIAS AMOSTRAS DO MODELO COM 6 VL.....	80
FIGURA 33 - SINTESE DE DIACILGLICEROFOSFOCOLINA.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LEPROSÁRIOS EM FUNCIONAMENTO NO BRASIL EM 1940.....	26
TABELA 2 – CASOS NOVOS DE HANSENÍASE NO BRASIL POR REGIÃO E ANO DE DIAGNÓSTICO NO PERÍODO DE 2006 A 2010	36
TABELA 3 – COEFICIENTE DE DETECÇÃO DE CASOS NOVOS DE HANSENÍASE POR REGIÃO.....	37
TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS.....	52
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (N = 24) TESTADO NO MODELO COM 6 VL PARA PREDIÇÃO DAS AMOSTRAS CONTROLES E COM HANSENÍASE.	81
TABELA 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS IDENTIFICADOS VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO ^A	82
TABELA 7 – LIPÍDIO DE M/Z=756.5551 IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO ^A	83
TABELA 8 - LIPÍDIO DE M/Z=701.5606 IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO ^A	85
TABELA 9 - LIPÍDIO DE M/Z=774.5659 IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO ^A	88
TABELA 10 - LIPÍDIO DE M/Z=790.5606 IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO ^A	89

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – INTENSIDADE DA $m/z=756.5551$ NOS GRUPOS	85
GRÁFICO 2 – INTENSIDADE DA $M/Z= 701.5606$ NOS GRUPOS TUBERCULÓIDE, VIRCHOWIANO, DIMORFO E CONTROLE	86
GRÁFICO 3 - INTENSIDADE DA $m/z= 774.5659$ NOS GRUPOS TUBERCULÓIDE, VIRCHOWIANO, DIMORFO E CONTROLE	89
GRÁFICO 4 - INTENSIDADE DA $m/z= 790.5606$ NOS GRUPOS TUBERCULÓIDE, VIRCHOWIANO, DIMORFO E CONTROLE	90

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - EFEITOS COLATERAIS DA RIFAMPICINA	41
QUADRO 2 - EFEITOS COLATERAIS DA CLOFAZIMINA.....	42
QUADRO 3 - EFEITOS COLATERAIS DA DAPSONA.....	42
QUADRO 4 - EFEITOS COLATERAIS DA TALIDOMIDA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	- Acetonitrila
B	- Borderline
BAAR	- bacilo álcool-ácido resistente
BB	- borderline-borderline
BL	- borderline-lepromatoso
BT	- borderline-tuberculóide
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEB-UFPR	- Centro de Estudos em Biofarmácia
CG-EM	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-EM	- espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa
CLAE/ESI-EM	- cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i>
CLAE-EM/EM	- cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas sequencial
CP	- componentes principais
CSV	- Comma-separated values
D	- Dimorfa
Da	- Dalton
DIMS	- Infusão direta por espectrometria de massas
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DPS	- Dapsona
EFS	- extração em fase sólida
ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay
EM	- espectrometria de massa
FIA-EM/EM	- análise de injeção em fluxo e espectrometria de massas sequencial
FT-ICR-MS	- ionização por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier
FT-IR	- espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HCA	- métodos de agrupamentos hierárquicos
I	- Indeterminada

IgM	- Imunoglobulina M
kDa	- kilodalton
L	- lepromatoso
LAM	- Lipoarabinomanana
LCR	- líquido cefalorraquidiano
LL	- lepromatoso-lepromatoso
LM	- Lipomanana
<i>M. leprae</i>	- <i>Mycobacterium leprae</i>
m/z	- razão massa/carga
MB	- Multibacilares
Mb	- Megabyte
MH	- mal de Hansen
Min	- Minuto
mL	- Mililitro
ML-Flow	- fluxo lateral
MNT	- micobactérias não-tuberculosas
MORHAN	- Movimento de Reintegração de Pessoas Atingidas pela Hanseníase
MTD	- terapia multidroga
NIPLS	- Non-linear iterative partial least squares
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPAS	- Organização Pan-Americana de Saúde
OSC	- correção ortogonal de sinal
PAPM	- proteínas de alto peso molecular
PB	- Paucibacilares
PCA	- Análises de Componentes Principais
PCR	- Polymerase Chain Reaction
pg	- picograma
PGL-1	- glicolípido fenólico 1
PIM	- monosídeo fosfatidil inositol
PLS	- Análises de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
PNEH	- Programa Nacional da Hanseníase
PQT	- poliquimioterapia

PQT	- Poliquimioterapia
RFM	- Rifampicina
RMN	- ressonância magnética nuclear
RMSECV	- raiz quadrada do erro médio da validação cruzada
SBH	- Sociedade Brasileira de Hansenologia
SDV	- decomposição do valor singular
SIMCA	- modelagem independente de analogias em classe
SINAN	- Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNL	- Serviço Nacional de Lepra
SPSS	- software <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SUS	- Sistema Único de Saúde
T	- Tuberculóide
TFA	- ácido trifluoracético
TMM	- monomicolato trealose
TOF	- Time-of-Flight
TT	- tuberculóide-tuberculóide
UPLC	- cromatografia líquida de alta eficiência
V	- Virchowiano
VL	- variáveis latentes
µm	- micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo Geral.....	21
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	A HANSENÍASE	23
2.2	CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE	30
2.2.1	CLASSIFICAÇÃO DE MADRI	30
2.2.2	CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING	31
2.2.3	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE...31	
2.3	AGENTE ETIOLÓGICO.....	32
2.3.1	Morfologia do <i>Mycobacterium leprae</i>	33
2.3.2	Transmissão da hanseníase.....	35
2.3.3	Epidemiologia	36
2.4	DIAGNÓSTICO.....	38
2.5	TRATAMENTO	39
2.5.1	EFEITOS COLATERAIS DOS MEDICAMENTOS.....	40
2.6	METABOLÔMICA E METABONÔMICA	43
2.7	ESPECTROMETRIA DE MASSAS ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA APLICADA A ESTUDOS METABOLÔMICOS	45
2.7.1	Amostras utilizadas em metabolômica	46
2.7.2	Interpretação dos dados metabolômicos	47
2.8	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	50
3.2	ANÁLISES EM ESPECTROMETRO DE MASSAS	51
3.3	ANÁLISE DOS DADOS	51
4	RESULTADOS	52
4.1	QUANTIDADE DE PLASMA UTILIZADO PARA AS ANÁLISES	54
4.2	PROCESSAMENTO DOS CROMATOGRAMAS ADQUIRIDOS PARA AS ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	59

4.3	PROCESSAMENTO DOS BIOMARCADORES IDENTIFICADOS PELO SOFTWARE MARKERLYNX ATRÁVÉS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	71
4.3.1	Gráfico de scores dos grupos experimentais.....	73
4.3.2	Gráfico de influências (Loadings)	75
4.4	ANÁLISE DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)	76
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa e crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e ainda é um problema de saúde pública em muitos países dos continentes Asiático, Africano e Americano, incluindo o Brasil. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2012, 105 países e territórios tiveram casos da doença e 182 mil pacientes estavam em tratamento. No continente americano, o Brasil é responsável por 94% dos casos, e é o segundo país em número absoluto em incidência, perdendo apenas para Índia (MARTINS; CAPONI, 2010).

Os esforços globais para controlar a hanseníase por quimioterapia intensiva têm levado a uma redução significativa no número de pacientes, mas a taxa de detecção de novos casos foi mantida constante, com uma pequena redução, o que significa que as estratégias de controle não estão tendo a eficácia desejada (GOULART; GOULART, 2008).

O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente com tropismo pela pele e sistema nervoso periférico. Sendo assim, a hanseníase é caracterizada por uma infecção granulomatosa crônica da pele e dos nervos periféricos. O comprometimento neural na hanseníase pode levar a incapacidade física irreversível e, até o momento, não existem medidas profiláticas capazes de impedir o avanço da doença nos locais onde ela é endêmica (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Além disso, o aparecimento da doença na pessoa infectada pelo bacilo e suas diferentes manifestações clínicas dependem da resposta do sistema imunológico do organismo atingido e pode ocorrer após um longo período de incubação, entre 2 a 7 anos.

Atualmente, o diagnóstico da hanseníase é baseado principalmente em manifestações clínicas e a escassez de sintomas no início da doença pode contribuir para erros no diagnóstico ou para o sub-diagnóstico. O principal teste laboratorial utilizado para diagnóstico da hanseníase baseia-se na detecção de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaços de linfa e em biópsias de lesões de pele. O resultado é fornecido como índice baciloscópico, porém este teste não apresenta especificidade e sensibilidade suficientes, especialmente para a forma paucibacilar da doença. O exame histopatológico de lesão de pele pode auxiliar o diagnóstico clínico, principalmente quando são evidenciados a agressão neural e a presença de bacilos (STEFANI, 2008).

Testes moleculares e imunológicos foram desenvolvidos para o diagnóstico e prognóstico da hanseníase, entre eles a PCR (Polymerase Chain Reaction), o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e outros testes sorológicos, como o fluxo lateral (ML-Flow). Estas tecnologias são empregadas com diferentes marcadores e estratégias e vem sendo utilizadas apenas para fins de pesquisa não sendo implementadas na rotina clínica. Além destas, técnicas de imagem, como a ultrassonografia e a ressonância magnética também foram desenvolvidas para avaliar a hanseníase neural pura, um tipo da doença sem lesões cutâneas aparentes e caracterizada por sintomas e sinais neuronais com alterações de sensibilidade (GOULART et al., 2008).

As tecnologias de pesquisa como a metabolômica (estudos dos metabólitos de células e tecidos) desempenham papéis cada vez mais importantes na investigação de sistemas biológicos complexos (FRANCESCHI et al., 2013). Isso porque a metabolômica é sugerida como a tecnologia que provê a maior informação funcional de um sistema biológico por serem os metabólitos os produtos finais dos processos de regulação celular. Sendo assim, tanto a presença destes metabólitos quanto seus níveis podem ser considerados a melhor resposta do organismo frente a mudanças genéticas e ambientais (FIEHN, 2002; RYAN; ROBARDS, 2006).

Muitas técnicas analíticas vêm sendo empregadas para os estudos metabolômicos, incluindo espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa (EM), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e espectroscopia Raman. No entanto, nos últimos anos a EM vem sendo considerada a ferramenta de referência para estudos metabolômicos devido às vantagens de alta sensibilidade, alta precisão, ampla faixa dinâmica, robustez na determinação do peso molecular e capacidade para identificar metabólitos (LIN et al., 2010).

É conhecido que as patologias promovem alterações características de um ou mais metabólitos específicos em tecidos e/ou biofluidos corporais e, sendo assim, estes metabólitos podem ser detectados no soro ou plasma sanguíneo, lágrima, suor, saliva, líquido cefalorraquidiano entre outros fluidos biológicos podendo ser utilizados como biomarcadores indicativos da presença de uma doença (ZHANG et al., 2007). A detecção de doenças por meio de biomarcadores em fluidos biológicos é extremamente atrativa, uma vez que podem possibilitar um diagnóstico rápido da

doença sem a necessidade de procedimentos muito invasivos (VEENSTRA et al., 2005).

Diante disso este trabalho pretende identificar biomarcadores para a detecção da hanseníase utilizando análise por cromatografia em coluna acoplada ao espectrômetro de massas. Serão utilizadas amostras de sangue de pacientes sadios (controle) e de pacientes diagnosticados com hanseníase com o objetivo de obter perfis específicos de metabólitos (*fingerprints*), possibilitando a diferenciação entre os grupos de estudo através das análises quimiométricas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Utilizar as técnicas de espectrometria de massas associada a Análises de Componentes Principais (PCA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para obter o diagnóstico da hanseníase, utilizando plasma de pacientes portadores desta enfermidade.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Obtenção de amostras de plasma sanguíneo de pacientes sadios e pacientes portadores de hanseníase.
- b) Tratamento das amostras por precipitação das proteínas de alto peso molecular, deixando disponíveis as de baixo peso molecular amplamente estudadas como possíveis biomarcadores.
- c) Aquisição de dados via cromatografia a líquido das amostras de plasma sanguíneo, provenientes de pacientes sadios e com diferentes tipos de hanseníase.
- d) Busca de sinais, nos espectros de massas, que indiquem possíveis biomarcadores responsáveis pela discriminação entre doente e sadio nos diferentes tipos de hanseníase.

- e) Aplicação de análises de componentes principais (PCA) sobre os espectros de massas adquiridos, para averiguar a discriminação em grupos: sadio (controle) ou doente (hanseníase).
- f) Aplicação de Análises de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) sobre os espectros de massas adquiridos para a construção de modelos de predição de novas amostras.
- g) Emprego dos modelos obtidos na predição de novas amostras (sadio ou doente).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A HANSENÍASE

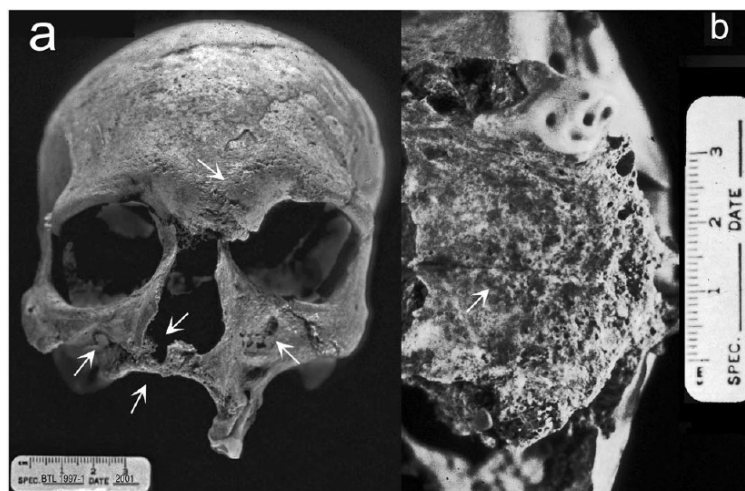
Também chamada de mal de Hansen (MH) ou lepra a hanseníase é uma doença infecto contagiosa que acomete a pele e os nervos periféricos provocando alterações da sensibilidade (tátil, térmica e dolorosa) provocada pelo *Mycobacterium leprae* (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; EICHELMANN et al., 2013).

Em uma escavação na cidade de Balathal, localizada a 40 km a nordeste de Udaipur, no estado contemporâneo de Rajasthan, Índia, foram encontrados registros arqueológicos do período calcolítico 2000 aC.(ROBBINS et al., 2009)

A descrição das deformidades encontradas em um dos crânios, nesta escavação, são compatíveis com as deformidades causa pela hanseníase (ROBBINS et al., 2009).

A patologia óssea neste esqueleto facial inclui erosão/remodelação das margens laterais e inferior, atrofia completa da espinha nasal anterior, lesões ósseas na região infra-orbital da maxila. Há evidência para a infecção em macroporosidade da região supraorbital em glabella, e reabsorção da região alveolar anterior da maxila indicadas pelas setas (Figura 1a). O processo palatino da maxila também demonstra alterações patológicas incluindo *pitting* (corrosões) perto da linha média e na região alveolar indicando inflamação superficial nas regiões afetadas (Figura 1b) (ROBBINS et al., 2009).

FIGURA 1 - CRÂNIO DO PERÍODO CALCOLÍTICO ENCONTRADO NA ÍNDIA



FONTE: Robbins *et al*, 2009.

Também há relatos da doença no Egito antigo (HULSE, 1972), China, civilização grega, romana e povos celtas (MARIOTTI *et al.*, 2005). Na idade média, tornou-se um problema grave de saúde (MONOT *et al.*, 2005). Ela foi marcada por estigmas sociais devido às deformidades na aparência que causava às pessoas infectadas. Essas eram segregadas, onde viviam em aldeias ou em leprosários (TAYLOR *et al.*, 2000; LIKOVSKÝ *et al.*, 2006).

Ela foi trazida ao Brasil com os colonizadores portugueses que aqui chegaram e foi disseminada através dos escravos. No sul do país ela foi proveniente dos povos de Portugal, Espanha, França, Rússia e Países Balcânicos. A Hanseníase propagou-se pelo litoral sendo que alguns focos sofreram ampliação enquanto em outros houve a redução e o desaparecimento da doença (BRASIL, 1960).

O indivíduo que apresentava os sintomas da hanseníase era mandado para fora das cidades e não poderia mais permanecer no local em que vivia. Quando chegavam próximos a vilarejos, suas presenças eram anunciadas com o som de matracas e muitas pessoas depositavam esmolas na frente das casas e se fechavam até que os doentes fossem embora (SCHNEIDER, 2009).

Por muitos séculos esta doença permaneceu envolto a mistérios sobre a sua causa, forma de contágio e de cura.

Foi durante a Primeira Conferência Internacional de Leprologia que ocorreu em 1897, na cidade de Berlim que foi estabelecida a primeira medida profilática: o

isolamento dos doentes. Esta medida foi proposta por Gerhard Hansen – o mesmo que visualizou o bacilo da doença mais de duas décadas antes – e constituiu a primeira proposição médica para o cuidado com os doentes pois não sabia como ocorria a sua transmissão (CUNHA, 2005).

No início do século XX o mal de Hansen tornou-se um problema de ordem social. O Brasil, apoiado pelos discursos médicos para normatizar a doença, e devido a falta de tratamento eficaz contra ela, construiu diversos hospitais destinados aos doentes. Esses hospitais eram pequenas “cidades”, contando com mercado, casas, quadra de esportes, entre outros para que, uma vez ali internados, não precisariam mais deixar o local. Havia a idéia de que a separação dos doentes dos demais sanaria a questão da hanseníase (SCHNEIDER, 2009).

Ainda no século XX a legislação sanitária brasileira foi reformulada e Oswaldo Cruz que assumiu a Diretoria Geral de Saúde Pública implantou a notificação compulsória da hanseníase (ORNELLAS, 1997).

Como o único tratamento era o isolamento dos doentes, Oswaldo Cruz enviou, em 1904, um relatório ao ministro da Justiça e Negócios Interiores sugerindo a criação de leprosários: “Lepra – uma moléstia que está alastrando-se pela cidade, fazendo um número crescente de vítimas [...]. O leproso pode, durante anos, dedicar-se ao trabalho [...] sua sequestração da sociedade deve ser feita não num hospital, mas em estabelecimentos adequados, as colônias de leprosos” (ORNELLAS, 1997).

E em 1920, foram implantados o leprosário – onde deveriam ser internados os infectados pela doença; o dispensário – que abrigaria quem esteve em contato com um doente; e o preventório – que era destinado aos filhos dos doentes. Em 1926 foi instituída uma lei que permitia que os doentes fossem internados compulsoriamente (SCHNEIDER, 2009).

Neste período foram construídos três leprosários: a Lazarópolis do Prata; o leprosário São Roque, em 1926, no Paraná; e o Hospital Colônia Curupaiti, no Distrito Federal, em 1929. O leprosário São Roque tinha o formato recomendado pela Inspetoria de Profilaxia da Lepra e das Doenças Venéreas – criado em 1920 - contando com um pavilhão central, administração, consultórios, salas de trabalho, de lazer, de observação, e aposentos particulares (CUNHA, 2005). Na década de 1940 já existiam vários leprosários em funcionamento no Brasil, conforme observamos na Tabela 1:

TABELA 1 - LEPROSÁRIOS EM FUNCIONAMENTO NO BRASIL EM 1940

Leprosário	Estado	Ano
Souza Araújo (Rio Branco)	AC	1928
Cruzeiro do Sul	AC	1938
Leprosário de Paricatuba	AM	1931
Lazarópolis do Prata	PA	1924
Colônia Marituba	PA	1942
Colônia do Bonfim	MA	1937
Colônia São Lázaro (iniciativa privada)	PI	1931
Leprosário Antônio Diogo	CE	1928
Colônia São Francisco de Assis	RN	1929
Colônia Getúlio Vargas	PB	1941
Colônia de Mirueira	PE	1941
Colônia Eduardo Rabello	AL	1940
Hospital D. Rodrigo de Menezes	BA	1787
Colônia Itanhenga	ES	1937
Colônia Tavares de Macedo	RJ	1938
Hospital Frei Antônio (antigo dos Lázaros)	DF	1741
Hospital Colônia Curupaiti	DF	1928
Asilo-Colônia Santo Ângelo	SP	1928
Colônia Pirapitingui	SP	1933
Sanatório Padre Bento	SP	1931
Colônia Aimorés	SP	1934
Colônia Cocais	SP	1934
Colônia São Roque	PR	1926
Colônia Santa Tereza	SC	1940
Colônia Itapoan	RS	1940
Colônia Santa Isabel	MG	1931
Hospital dos Lázaros de Sabará	MG	1883
Colônia Santa Fé	MG	1942
Hospital Helena Bernard	GO	1935
Asilo Anápolis	GO	1935
Asilo Bananal	GO	1935
Colônia São Julião	MT	1941
Asilo São João dos Lázaros	MT	1815

FONTE: Adaptado de Cunha, 2005.

No governo de Getúlio Vargas (1930-1945) foram intensificadas às ações de combate a hanseníase com a criação do Serviço Nacional de Lepra (SNL) que elegia e coordenava as medidas de combate à lepra (FARIA, 2009).

No início da década de 40, surgiu o primeiro tratamento medicamentoso contra a hanseníase. As sulfonamidas se mostraram eficazes e evitaram o surgimento de novos casos. Como representante deste grupo farmacológico temos a dapsona começou a ser usada em pacientes hansenícos (MOREIRA, 2003).

Em 1957 foi descoberta a rifampicina e também passou a ser utilizada no tratamento da hanseníase. A associação da dapsona com rifampicina mostrou-se muito eficaz e os pacientes curados. (CETOLIN et al., 2010).

Em 1958 no VII Congresso Internacional de Lepra realizado na cidade de Tóquio os pesquisadores consideraram que a transmissão da doença não era hereditária e que, com o uso da dapsona e da rifampicina, o mal de hansen poderia ser curado. Começava a ser discutida a possibilidade de não mais isolar o doente da comunidade (MACHADO, 2004).

Em 1962, com o Decreto n°. 968, o Brasil começou a deixar a prática de isolamento dos pacientes, porém em alguns casos essa prática ainda era adotada (BRASIL, 1962).

Em 1970, a Organização Mundial de Saúde passa a reconhecer os esquemas terapêuticos no combate a hanseníase com o uso da rifampicina (RFM) para os doentes Multibacilares (MB) e a monoterapia sulfônica com dapsona (DDS) aos doentes Paucibacilares (PB) sendo que o tratamento seria de 5 anos para os pacientes MB e de 2 anos para os PB. (NOGUEIRA; MARZLIAK, 1997).

A partir de 1972 a internação dos doentes em leprosários passou a ser facultativa. Foi inserido o tratamento ambulatorial onde cessadas as motivações do internamento no leprosário o paciente passava a ser acompanhado no ambulatório. Isso fez com que o paciente fosse reintegrado a sociedade novamente, podendo retomar as suas atividades como trabalho e estudo que fora interrompida pela internação (CLARO, 1995).

O governo também mudou o foco das ações contra a hanseníase que passou a ser de prevenção e os recursos financeiros, que antes era concentrado nas colônias, passou para os ambulatórios onde era feito o diagnóstico e prevenção da doença. Em 1975 houve a criação da Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária juntamente com a proscrição do nome lepra e de seus derivados de todos os

documentos do Ministério da Saúde. Em 1986 as internações de pacientes por hanseníase foram proibidas e o nome de “Leprosário” ou “Colônia” foram renomeados para “Casa de Saúde” ou “Hospital de Dermatologia Sanitária” (FARIA, 2009).

No período de 1976 a 1985 o tratamento dos pacientes não era supervisionado. No ano de 1976 foi incluído no tratamento a clofazemina, descoberta na década de 1960, nos casos em que o bacilo era resistente a sulfonamida. No ano de 1986, foi elaborado um protocolo para o uso da poliquimioterapia (PQT), que seria adotado somente em 1987 (ANDRADE, 2006).

No Brasil, desde 1985, o país vem reestruturando suas ações voltadas para este problema e, em 1999 assumiu o compromisso, perante a OMS de eliminar a hanseníase até 2005, quando se objetiva alcançar o índice de menos de um doente em cada 10.000 habitantes (BRASIL, 2002).

Essa meta não foi atingida por vários fatores, entre eles: a distribuição da doença no território, a falta de acesso da população aos serviços de saúde e carência de atualização dos profissionais sobre a enfermidade. O atraso no diagnóstico gera um grave problema epidemiológico, pois os indivíduos multibacilares sem tratamento acabam disseminando a doença, que é infecto-contagiosa. Isso representa uma importante fonte de infecção e de manutenção da cadeia epidemiológica da doença (MOREIRA, 2003).

Em 2004, foi criado o Programa Nacional da Hanseníase (PNEH) que estabeleceu um novo direcionamento da política de eliminação da hanseníase, enquanto problema de saúde pública. Como princípio básico, orientava para uma visibilidade da distribuição e da concentração da endemia em todo o território nacional. Teve como proposta de trabalho a parceria com as organizações não-governamentais e com entidades governamentais e civis, entre as quais se destacaram: o Movimento de Reintegração de Pessoas Atingidas pela Hanseníase (MORHAN); a Sociedade Brasileira de Hansenologia (SBH), que atua na formação de recursos humanos para a atenção na média e na alta complexidade, como suporte à rede do Sistema Único de Saúde (SUS); a Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), que garantia o suprimento de medicamentos e oferecia cooperação técnica e financeira, entre outras instituições (BRASIL, 2006).

De 2006 a 2010, o Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase (PNEH) do Ministério da Saúde, colocava como princípio norteador a garantia de intervenções constantes e contínuas para assegurar a redução da ocorrência dos casos. As atividades de diagnóstico, tratamento, vigilância epidemiológica com exames dos comunicantes, prevenção das incapacidades/deficiências, reabilitação e encaminhamento das complicações segundo os níveis de complexidade da assistência foram financiadas com recursos do SUS (BRASIL, 2006).

A partir dessas e outras ações, e com vistas à educação em saúde nos diferentes níveis de evolução dos seus serviços, é que o PNEH esperava obter mudanças no controle da doença. Considerando o princípio da sustentabilidade proposta pelo Ministério da Saúde e pela OMS, é que se objetivava chegar em 2010, com o coeficiente de prevalência por município, de menos de um doente para cada 10.000 habitantes (BRASIL, 2006).

O Ministério da Saúde focou as ações nas regiões de maior risco em adquirir a doença que foram chamados de clusters. Esses abrangiam 1.173 municípios do país (CETOLIN et al., 2010).

Novamente a meta de eliminar a hanseníase não foi atingida então foram definidas novas estratégias de ação para eliminar a hanseníase até 2015. Estas consistiam de: busca ativa de casos em escolares e seus contactantes (67% dos casos diagnosticados no ano de 2010 foram em adolescentes com idade menor de 15 anos), aumento da detecção precoce de novos casos e na cura dos casos já diagnosticados (BRASIL, 2013).

Mesmo com essas ações o Brasil, juntamente com Índia e Indonésia foram responsáveis por 85%, dos 232 mil casos, que foram registrados no mundo no ano de 2012 (WHO, 2014).

Na América Latina, o Brasil apresenta o maior número de casos, com taxa de prevalência em torno de 1,51/10.000 habitantes. Em 2014 foram notificados 37.885 e em 2015 foram 28.761 notificações de casos novos. Isso faz com que o Brasil fique longe da meta estabelecida pelo OMS de 1 caso por 10.000 habitantes (WHO, 2012).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

Devido as várias formas de manifestações clínicas da doença houve a necessidade de fazer uma classificação. Foram feitas várias propostas como Manila (1931), Cairo (1938), Rio de Janeiro (1946), Havana (1948), Madri (1953), Tóquio (1958), Ridley e Jopling (1966) e OMS (1982) (BRASIL, 1960) na tentativa de fazer uma padronização dos sinais e sintomas.

Dentre estas, destacamos as três classificações que foram mais utilizadas, mostradas a seguir:

- 1) Classificação de Madri;
- 2) Classificação de Ridley & Jopling;
- 3) Classificação segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

2.2.1 CLASSIFICAÇÃO DE MADRI

A classificação de Madri é baseada nas características clínicas da doença, considerando os aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase. Podem ser definidos os seguintes grupos: tuberculóide (T), virchowiano (V) ou lepromatoso (L) que são as formas polares ou estáveis da doença; a indeterminada (I) que seria o estágio inicial ou transitória da doença; a forma borderline (B) ou dimorfa (D) caracterizando o estágio intermediário e instável da doença (MOSCHELLA, 2004; GOULART; GOULART, 2008; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Nesta classificação são considerados os sinais clínicos como: aspectos das lesões cutâneas (extensão, definição de margens, simetria, distribuição pelo corpo e número de lesões). No exame bacteriológico é verificada a presença ou ausência do *M. leprae*, aspectos morfológicos do patógeno, quantidade do patógeno presente, se estão íntegros e agrupados, se formam globias (aglomerados de bacilos no citoplasma das células). Também é avaliada a imunorreatividade à lepromina (reação de Mitsuda). Caso a reação seja positiva a pápula deverá ser ≥ 5 mm de diâmetro entre o 21º e 28º dia após a aplicação (SOUZA, 1997). No caso de biopsias, a descrição histológica das lesões pode variar de granulomas bem definidos a infiltrado difuso linfo-histiocitário (LANGUILLON; CARAYON, 1986).

2.2.2 CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING

A classificação de Ridley & Jopling leva em consideração o exame baciloscópio medido pela quantidade dos bacilos presentes nas biópsias cutâneas e esfregaços dérmicos e pela intensidade da resposta do paciente ao teste de Mitsuda.

São elas duas formas polares: tuberculóide-tuberculóide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL) ou virchowiano que é devido ao tipo de resposta imunológica do indivíduo após exposição ao bacilo (MOSCHELLA, 2004; GOULART; GOULART, 2008; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Na forma Tuberculóide o paciente apresenta baixa carga bacilar com elevada resposta celular e resposta imunológica do tipo TH1. A lesão cutânea é única ou em pequeno número com bordas pronunciadas, hipocrômicas, hipoestesia ou anestesia da face, mãos e pés com espessamento do nervo adjacente. No lepromatoso ou virchowiano a resposta imunológica é caracterizada pela formação de anticorpos com resposta do tipo TH2. Presença de pápulas, nódulos e máculas na pele, infiltrado difuso em face, orelhas, nádegas membros inferiores e superiores. Edema periférico, rinite e madarose (perda da sombrancelha). Comprometimento da mucosa nasal com perfuração do septo nasal, ginecomastia, atrofia testicular, paralisia dos nervos e a baciloscopia é positiva.

As formas polares são subclassificadas em três subgrupos intermediários: borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL) ou (dimorfa-tuberculoide, dimorfa-virchowiana) (RIDLEY; JOPLING, 1962; SHEPARD, 1969; MOSCHELLA, 2004; GOULART; GOULART, 2008; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

As formas intermediárias podem evoluir para uma das formas polares através de episódios clínicos, ocasionais ou recidivos que são chamados estados reacionais (RIDLEY; JOPLING, 1962).

2.2.3 CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

A OMS, em 1982, estabeleceu uma nova classificação da hanseníase com finalidade terapêutica, ou seja, cada classificação realiza um esquema terapêutico de tratamento diferente. Essa classificação foi feita conforme o índice baciloscópico

em paucibacilar (índice baciloscópio menor que 2+) e multibacilar (índice baciloscópio maior ou igual a 2+). Em 1988, foi estabelecido critérios clínicos levando em conta as lesões cutâneas. São classificados em paucibacilares os pacientes com até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso acometido e multibacilares os pacientes com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido (SHEPARD, 1969; MOSCHELLA, 2004; GOULART; GOULART, 2008; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O gênero *Mycobacterium* pertence à ordem *Actinomycetales* e a família *Mycobacteriaceae*. Neste gênero estão incluídos o *M. tuberculosis*, causador da tuberculose, e outros agentes infecciosos que são chamados de “micobactérias não-tuberculosas” (MNT) que causam infecções oportunistas. Temos como exemplo as espécies do complexo *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, e complexo *M. chelonae-abscessus* (EUZÉBY, 1997) e saprófitas como a *M. phlei*, *M. sphagni*, *M. gordonae* (INGEN, VAN et al., 2012).

O gênero *Mycobacterium* engloba 157 espécies (EUZÉBY, 1997), que são classificadas de crescimento rápido ou lento. Neste primeiro grupo o tempo de duplicação é de 3 a 4 horas suas colônias podem ser visíveis de 2 a 7 dias. No segundo grupo o tempo de reprodução é de aproximadamente 24 horas em meio axênico e se tornam visíveis no período de 2 a 6 semanas (GRANGE, 1996).

As principais infecções humanas que membros deste gênero podem causar são ocasionadas por micobactérias de crescimento lento e as colônias possuem semelhanças fenotípicas que não distinguem as espécies. Essas semelhanças não podem ser caracterizadas simplesmente por meios bioquímicos de identificação (KIM et al., 1999). O *M. leprae* possui uma particularidade pois é a única espécie do gênero que até os dias atuais ainda não foi cultivada em nenhum meio de cultura convencional (*in vitro*). Pode-se verificar o seu crescimento realizando a inoculação em tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* ou em camundongo na região plantar (SCOLLARD et al., 2006).

Em 1873, Gerhard Henrick Armaeur Hansen descobriu o agente infeccioso da lepra em biópsia de pele humana, sendo este o primeiro patógeno bacteriano a ser

identificado como causador de uma doença infecciosa humana. Entretanto, a tentativa de cultivar o *M. leprae in vitro* foi frustrada (COLE et al., 2001).

Uma característica do *M. leprae* é seu tropismo pelas células de *Schwann*, que representa a base da grave neuropatia que podem levar à perda senso-motora, responsável pela maioria das deformidades e incapacidades físicas associadas à Hanseníase (ARAÚJO, 2003).

2.3.1 Morfologia do *Mycobacterium leprae*

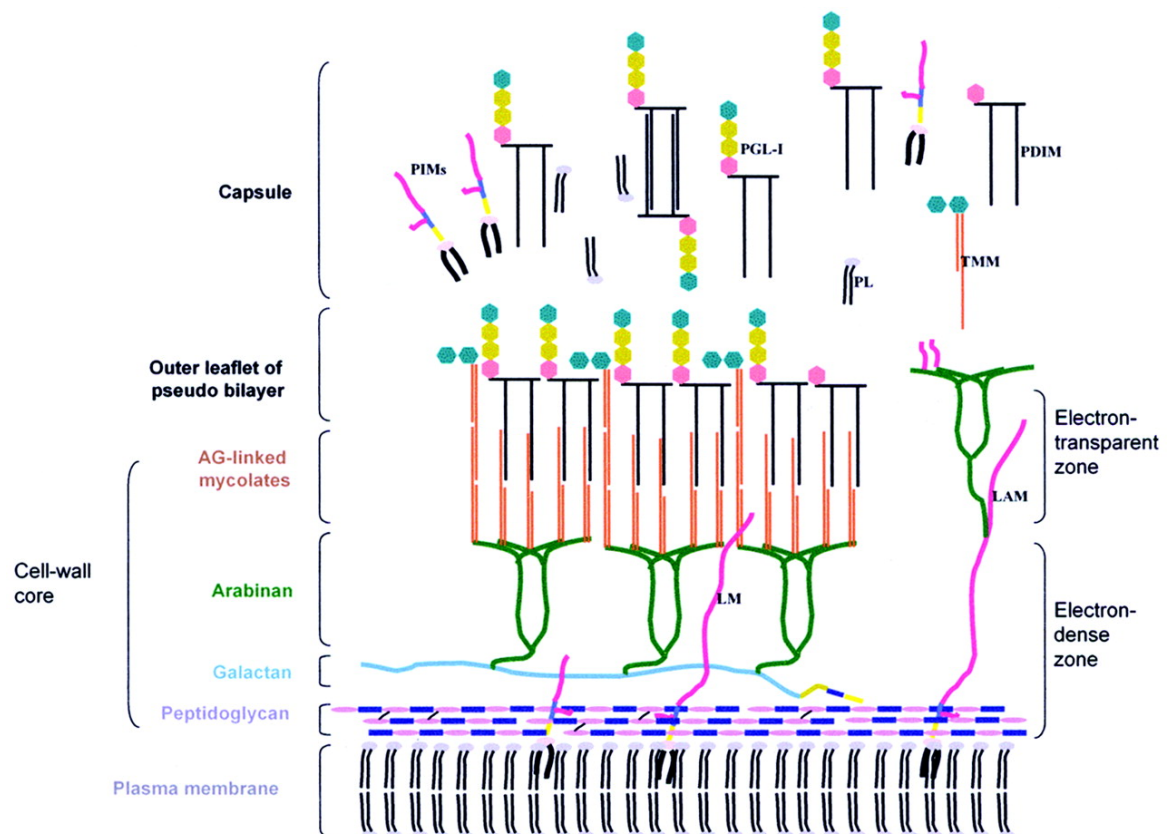
O *M. leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória, imóvel, não forma esporos e é microaerófila. Quando em contato com a fucsina ela se cora de vermelho e não se descora com a solução de álcool ácido portanto ela é considerada um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Quando observada em microscopia apresenta um formato de hastes retas ou ligeiramente curvas com um comprimento de 1,5 a 8 µm e com largura de 0,2 a 0,5 µm. Ela faz parte das micobactérias de crescimento lento com um tempo de duplicação de 12 a 21 dias aproximadamente. Pode-se apresentar nos esfregaços células isoladas ou em agrupamentos. Nestes agrupamentos recebe o nome de globias (SCOLLARD et al., 2006).

A membrana plasmática do *M. leprae* é recoberta por peptidoglicano ligada a arabinogalactana que possui ácidos micólicos ligados (ZUBER et al., 2008). Esses ácidos micólicos estão envolvidos nos processos de sobrevivência, crescimento e patogenicidade das micobactérias. Também contribuem para a permeabilidade da parede celular conferindo uma resistência intrínseca aos antibióticos, desidratação e ao dano químico (SCHERR; NGUYEN, 2009).

O *M. leprae* possui um envelope celular composto por folhetos lipídicos que formam uma bicamada lipídica que funciona como uma barreira de permeabilidade e cria um espaço periplasmático (HOFFMANN et al., 2008). É possível observar, conforme a Figura 2, que a porção externa da parede celular é composta por glicolipídeos como lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM), polissacarpídeos, fosfolipídeos, monomicolato trealose (TMM), monossídeos fosfatidilinositol (PIM) que estão relacionados com a interação patógeno-hospedeiro, principalmente nas interações com o sistema imune (SCHERR; NGUYEN, 2009).

O principal glicolípido que compõe a parede celular, conferindo uma especificidade imunológica do *M. leprae* é o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) (VISSA; BRENNAN, 2001). Alguns estudos sugerem que o PGL-1 está presente no processo de interação do bacilo com a célula nervosa periférica, mais especificamente com a laminina das células de Schwann (NG et al., 2000).

FIGURA 2 - ENVELOPE CELULAR DE *M. leprae*



FONTE: Scollard et al, 2006.

O genoma completo do *M. leprae* contém aproximadamente 3,3 Mb. Aproximadamente 49,5% do genoma são compostos por genes que codificam proteínas. Em torno de 23,5% dos genes são codificadores das sequências regulatórias e os 27% restantes são compostos de pseudogenes. (COLE et al., 2001).

Considerando que o genoma de *M. leprae* é topologicamente equivalente e de tamanho relativamente menor que outras micobactérias que tem em média 4,4 Mb, é provável que uma extensiva redução e rearranjo deve ter ocorrido durante a evolução do *M. leprae*. Caso todos os genes do genoma de *M. leprae* fossem ativos

era de se esperar a codificação de cerca de 3.000 proteínas quando comparadas com as 4.000 preditas para *M. tuberculosis*, indicando que os pseudogenes são inertes. Além disso, a partir da divergência do último ancestral comum micobacteriano, o bacilo da *M. leprae* pode ter perdido mais do que 2.000 genes (COLE et al., 2001).

2.3.2 Transmissão da hanseníase

Ainda não está bem estabelecido o modo de transmissão do *M. leprae*, mas os indícios apontam que seja pelos aerossóis expelido pelas vias aéreas de pacientes multibacilares não tratados. O bacilo entra em contato com a mucosa nasal ou vias aéreas superiores de uma pessoa suscetível que poderá desenvolver a doença (NOORDEEN, 1994). Pode ocorrer a contaminação pela eliminação de bacilos pela cavidade oral e eventualmente pelo contato direto com uma pessoa infectada (LAVANIA et al., 2008).

Estudos apontam que os tatus são um reservatório de *M. leprae* nas Américas (TRUMAN et al., 2011; FROTA et al., 2012). A presença do bacilo na espécie *Dasypus novemcintus* ocorre naturalmente e sua suscetibilidade já vem sendo estudada desde a década de 1970 como o principal modelo animal para estudar a hanseníase (SCOLLARD et al., 2006; TRUMAN et al., 2011).

Em um estudo, foram detectados vestígios de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *M. leprae* em água de lavados de peles de pacientes multibacilares não tratados utilizando a técnica da PCR. Pode-se ter aí uma nova via de transmissão da doença. Também foi encontrada a presença de DNA na secreção nasal de pacientes doentes com a forma MB (JOB et al., 2008). Muitos estudos que utilizam a amplificação de DNA mostram que a cavidade nasal está relacionada com a disseminação da hanseníase (BARTON, 1974; DAVEY; REES, 1974; KLATSER et al., 1993; ALMEIDA et al., 2004)

Na Indonésia, o DNA do *M. leprae* estava presente na secreção nasal de 7,8% de pessoas saudáveis que viviam em uma região endêmica (KLATSER et al., 1993).

2.3.3 Epidemiologia

A hanseníase é uma doença muito antiga e atinge, principalmente, as regiões tropicais e subtropicais (TRUMAN et al., 2011). No mundo, em 2012, foram registrados 232.857 sendo que no Brasil foram registrados 33.303 casos (WHO, 2015).

Na Índia, neste mesmo período, foram registrados 134.752 novos casos. Isso equivale a 57,86% de todos os casos no mundo. O Brasil neste mesmo período foi responsável por 14,30% ficando com o segundo lugar dos novos casos no mundo. Os dois países foram responsáveis por aproximadamente 72,16% de todos os casos no globo (WHO, 2015).

Foi observado uma redução de aproximadamente 35,27% do número de casos novos de hanseníase na última década (tabela 2).

TABELA 2 – CASOS NOVOS DE HANSENÍASE NO BRASIL POR REGIÃO E ANO DE DIAGNÓSTICO NO PERÍODO DE 2006 A 2010

Região	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Norte	8.312	8.466	7.519	6.936	6.873	6.876	6.052	6.052	5.147
Nordeste	16.603	16.265	14.977	14.991	14.333	14.263	13.389	13.612	12.760
Sudeste	7.932	7.435	6.798	6.252	6.126	5.432	4.811	4.520	4.013
Sul	1.779	1.720	1.473	1.419	1.374	1.349	1.171	1.025	1.013
Centro-oeste	6.482	6.300	5.988	5.942	5.837	5.813	5.821	6.213	5.623
Exterior	156	602	1.461	309	229	272	307	322	205
Total	41.264	40.788	38.216	35.849	34.772	34.005	31.551	31.744	28.761

FONTE: Brasil (2016).

Nesta mesma década o coeficiente de detecção (número de casos em 100.000 habitantes) da hanseníase diminuiu aproximadamente 21,60 % conforme a tabela 3.

TABELA 3 – COEFICIENTE DE DETECÇÃO DE CASOS NOVOS DE HANSENÍASE POR REGIÃO

Região	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Norte	63,03	56,74	55,91	48,87	43,72	42,7	42,06	35,57	35,06	29,4
Nordeste	33,3	32,22	30,64	27,95	28,24	26,79	26,46	24,00	24,23	22,56
Sudeste	10,9	10,19	9,27	8,4	7,78	7,57	6,66	5,7	5,31	4,68
Sul	7,16	6,65	6,26	5,31	5,18	4,99	4,86	4,07	3,53	3,47
Centro-oeste	53,37	49,02	46,00	43,09	42,29	40,98	40,3	38,82	40,82	36,41
Total	23,79	22,24	21,51	19,96	18,8	18,07	17,53	15,69	15,65	14,07

FONTE: Brasil, 2016.

No ano de 2015 foram registrados no Brasil 28.761 novos casos de hanseníase (tabela 2) e o coeficiente de detecção ficou em torno de 14,07 por 100.000 habitantes, conforme a tabela 3 (BRASIL, 2016).

Em 2010 foram registrados no Brasil cerca de 35.849 casos novos de hanseníase. Destes, 40% eram MB e 6,42% em menores de 15 anos. Dados da Secretaria Estadual do Ceará mostram que em 2011 foram diagnosticados 2.003 casos novos no estado, alcançando um coeficiente de detecção geral de 23,7/100.000 habitantes. Estes dados tornam o estado do Ceará o 13º lugar nacional e o 4º lugar do Nordeste, em número de casos novos da doença. A média anual de ocorrência da doença em menores de 15 anos é de 5,9%, o que demonstra a existência de focos ativos de transmissão da hanseníase (OMS, 2012) (SECRETARIA DA SAÚDE – CEARÁ, 2012).

Muitos esforços têm sido gerados pela OMS como “A Estratégia global aprimorada para maior redução dos casos da hanseníase (Período do Plano: 2011-2015)”, a qual foi adotada e implementada por programas nacionais de hanseníase em países onde a doença é endêmica (WHO, 2012). Este programa tem duas metas que se destacam: reduzir em 35% a taxa de casos novos com grau 2 de incapacidade (deficiências visíveis) em todo o mundo até o final de 2015 em comparação com a linha de base no final de 2010; e reduzir para um caso novo de hanseníase com grau dois de incapacitação para cada um milhão de habitantes até 2020. Espera-se que a definição de uma meta global com base na redução da ocorrência destes casos estimule a eficiência no diagnóstico da doença e na administração de tratamento imediato com a PQT. Com a redução na ocorrência de

casos espera-se, conseqüentemente, ter um impacto na redução da transmissão da doença na comunidade (WHO, 2011).

2.4 DIAGNÓSTICO

Como citado a hanseníase não tem prevenção primária e os testes diagnósticos e prognósticos não são viáveis ou bem estabelecidos na rotina clínica (GOULART, 2008)

O diagnóstico da hanseníase pode ser realizado por meio de um critério clínico que avalia a presença de uma ou mais lesões na pele com diminuição ou perda da sensibilidade. Embora este critério seja simples, cobrindo a grande maioria dos casos de hanseníase PB cerca de 30% dos pacientes não possuem perda sensitiva, e a maioria dessas lesões são observadas em casos de hanseníase MB. A demora na detecção desse último grupo pode ser a causa principal da transmissão (BÜHRER-SÉKULA, 2008).

Os casos MB são as principais fontes de infecção da hanseníase na comunidade e possuem o maior risco de desenvolver alguma deficiência do que aqueles com a doença PB, sendo assim, o correto diagnóstico necessita da presença de um ou mais de três sinais cardinais, ou seja, lesões cutâneas sem sensibilidade, medida da espessura dos nervos periféricos e pesquisa de bacilos álcool-ácidos resistente na pele por meio de esfregaço ou biópsia (BIZUNEH et al., 2002). No entanto, por várias razões operacionais, a maioria dos profissionais de saúde são incapazes de determinar corretamente a espessura do nervo periférico, e a qualidade do serviço de baciloscopia é muitas vezes deficiente.

Análises de genômica e proteômica comparativas entre genes/proteínas do *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* indicaram que 165 proteínas são específicas para o *Mycobacterium leprae* e potencialmente mais adequadas para o diagnóstico laboratorial da hanseníase. A decodificação do genoma do *M. leprae* também disponibilizou o estudo de novos antígenos e permitiu o uso de ferramentas de diagnóstico, tais como ELISA e PCR.

A técnica de PCR tem uma abordagem muito limitada para o diagnóstico da hanseníase, principalmente devido ao uso de *primers* diferentes, tamanhos de fragmentos amplificados e técnicas de amplificação (GOULART et al., 2008).

Na década de 80, o teste de ELISA com o PGL-1 foi bastante utilizado para o diagnóstico da hanseníase. Este antígeno espécie-específico do *M. leprae* pode ser encontrado no soro, urina e nódulos cutâneos de pacientes infectados. A sorologia anti-PGL-1 é altamente específica e a presença de anticorpos séricos se correlaciona com o índice bacilar dos pacientes multibacilares (BÜHRER-SÉKULA et al., 2001). Entretanto, a sorologia anti-PGL-1 tem limitado valor diagnóstico para hanseníase PB, pois esta categoria de pacientes tem índice bacilar baixo ou ausente e é caracterizada por resposta imunológica do tipo celular, ao invés de resposta do tipo humoral. Portanto, a detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1 é particularmente útil apenas no diagnóstico de hanseníase MB (STEFANI, 2008). Outra desvantagem da sorologia anti-PGL1 é a sua reatividade cruzada com outros componentes da parede celular de outras micobactérias (WEN et al., 2013).

2.5 TRATAMENTO

O óleo de chaulmoogra, que foi utilizado na Índia “desde tempos imemoriais”, quando atingiu as farmacopéias ocidentais, deixou de ser utilizado somente em sua versão pura para se tornar também a base de inúmeras fórmulas. Assim, tornou-se a substância mais preconizada pelos médicos nas primeiras décadas do século XX, sendo inclusive considerada como específica contra a lepra. Embora o uso de alguns medicamentos influenciasse o aparecimento de sinais de melhora, o verdadeiro caminho para se definir a curabilidade da lepra só seria desvendado décadas depois. A cura dos leprosos, no início do século XX, era ainda uma meta irrealizável, só concretizada na década de 1940 com o aparecimento das sulfonas. (CUNHA, 2005)

O tratamento do paciente com hanseníase é fundamental para curá-lo, fechar a fonte de infecção interrompendo a cadeia de transmissão da doença, sendo portanto estratégico no controle da endemia e para eliminar a hanseníase enquanto problema de saúde pública (BRASIL, 2002).

O tratamento específico da pessoa com hanseníase, indicado pelo Ministério da Saúde, é a poliquimioterapia padronizada pela Organização Mundial de Saúde, conhecida como PQT, devendo ser realizado nas unidades de saúde (BRASIL, 2002)

A poliquimioterapia é constituída pela administração conjunta de rifampicina, dapsona e clofazimina. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento (BRASIL, 2002)

Houve o relato de caso de um paciente diagnosticado no estado do Amazonas, onde o bacilo apresentava resistência a rifampicina (CONTRERAS MEJIA et al., 2014).

O tratamento dos casos de hanseníase PB é feito com a combinação de dapsona com rifampicina, seguindo o preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Uma dose mensal de rifampicina de 600 mg seguida de uma dose diária de dapsona de 100 mg. A duração do tratamento é de 6 a 9 meses com a dose mensal supervisionada (BRASIL, 2001, 2002; LASTÓRIA; ABREU, 2012; EICHELMANN et al., 2013).

No tratamento dos casos de hanseníase MB são utilizadas a rifampicina, dapsona e clofazimina, seguindo o preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Uma dose mensal de rifampicina de 600 mg, juntamente com uma dose mensal de clofazimina de 300 mg e uma dose diária de dapsona de 100mg. A duração do tratamento é 12 meses a 18 meses com a dose mensal supervisionada (BRASIL, 2001; LASTÓRIA; ABREU, 2012; EICHELMANN et al., 2013).

2.5.1 EFEITOS COLATERAIS DOS MEDICAMENTOS

Assim como os medicamentos em geral, aqueles utilizados na poliquimioterapia e no tratamento dos estados reacionais também podem provocar efeitos colaterais. No entanto, os trabalhos bem controlados publicados na literatura disponível permite afirmar que o tratamento PQT raramente, precisa ser interrompido em virtude desses efeitos colaterais (BRASIL, 2002).

A rifampicina pertence a classe dos antibióticos macrocíclicos complexos, sendo um composto semi-sintético sendo derivada da rifamicina B. Seu mecanismo de ação é a inibição da RNA polimerase dependente do DNA das micobactérias que leva à supressão da iniciação da formação da cadeia na síntese de RNA (GILMAN; GOODMAN, 2005). No Quadro 1 serão apresentados os possíveis efeitos colaterais da Rifampicina. O diagnóstico desses efeitos colaterais é fundamentalmente baseado nos sinais e sintomas por eles provocados.

QUADRO 1 - EFEITOS COLATERAIS DA RIFAMPICINA

Orgãos ou sistema	Efeitos colaterais
Pele	rubor de face e pescoço, prurido e rash cutâneo generalizado.
Gastrointestinais	diminuição do apetite e náuseas. Ocasionalmente, podem ocorrer vômitos, diarreias e dor abdominal leve.
Hepáticos	Pode ocorrer icterícia leve ou transitória e a grave, com danos hepáticos importantes. A medicação deve ser suspensa e o paciente encaminhado à unidade de referência se as transaminases e/ou as bilirrubinas aumentarem mais de duas vezes o valor normal.
Hematopoéticos	trombocitopenia; eosinofilia; púrpuras ou sangramentos anormais, como epistaxes. Poderão, também, ocorrer hemorragias gengivais e uterinas. Nestes casos, o paciente deve ser encaminhado ao hospital.
Síndrome Pseudogripal	febre, calafrios, astenia, mialgias, cefaléia, dores ósseas.
Renal	nefrite intersticial, necrose tubular aguda

FONTE: adaptado de Brasil, 2001

A clofazimina é um corante da fenazínico que se liga ao DNA da micobactéria nas regiões ricas em guanina e citosina. Ela também exerce um efeito antiinflamatório e impede o desenvolvimento do eritema nodoso da hanseníase. No Quadro 2 serão apresentados os possíveis efeitos colaterais da Clofazimina.

QUADRO 2 - EFEITOS COLATERAIS DA CLOFAZIMINA

Orgão ou sistema	Efeitos colaterais
Cutâneos	ressecamento da pele, que pode evoluir para iciose, alteração na coloração da pele e suor. Nas pessoas de pele escura a cor pode se acentuar, e em pessoas claras a pele pode ficar com uma coloração avermelhada ou adquirir um tom acinzentado, devido à impregnação e ao ressecamento. Estes efeitos ocorrem mais acentuadamente nas lesões hansênicas e regredem, muito lentamente, após a suspensão do medicamento.
Gastrointestinais	diminuição da peristalse e dor abdominal, devido ao depósito de cristais de clofazimina nas submucosas e linfonodos intestinais, resultando na inflamação da porção terminal do intestino delgado.

FONTE: adaptado de Brasil, 2001

A Dapsona pertence a classe das sulfonamidas, que são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA). Ela inibe a enzima diidropteroato-sintase a incorporar o PABA no ácido diidropteróico não ocorrendo a formação do ácido fólico. No Quadro 3 serão apresentados os possíveis efeitos colaterais da dapsona.

QUADRO 3 - EFEITOS COLATERAIS DA DAPSONA

Orgão ou sistema	Efeito colateral
Cutâneos	síndrome de Stevens-Johnson, dermatite esfoliativa ou eritrodermia;
Hepáticos	icterícias, náuseas e vômitos;
hemolíticos	tremores, febre, náuseas, cefaléia, às vezes choque, podendo também ocorrer icterícia leve, metahemoglobinemia, cianose, dispnéia, taquicardia, cefaléia, fadiga, desmaios, náuseas, anorexia e vômitos;

FONTE: adaptado de Brasil, 2001

Várias são as hipóteses do mecanismo de ação da talidomida. Ela tem um papel na regulação dos linfócitos auxiliares que aumentaria a produção das citocinas IL4 e IL5 e inibiria a produção dos linfócitos inflamatórios em células periféricas de

sangue auxiliando no tratamento do eritema nodoso da hanseníase (MARRIOTT et al., 1999) No Quadro 4 serão apresentados os possíveis efeitos colaterais da talidomida

QUADRO 4 - EFEITOS COLATERAIS DA TALIDOMIDA

Orgão ou sistema	Efeito colateral
	Teratogenicidade
Sistema nervoso central	sonolência
Hemolíticos	Linfopenia
Membros	Edema unilateral de membros inferiores, neuropatia periférica (não é comum podendo ocorrer em doses acumuladas acima de 40g e mais frequente em idosos)
Intestino	Constipação
Cavidade Bucal	Diminuição da secreção de saliva

FONTE: adaptado de Brasil, 2001

2.6 METABOLÔMICA E METABONÔMICA

Na metabonômica são quantificados os metabólitos responsáveis pelas respostas aos estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas. A metabonômica procura entender as mudanças a nível de sistema que ocorrem ao longo de um período. Na metabolômica o objetivo é uma descrição analítica da caracterização e da quantificação das moléculas de baixo peso molecular (1.500 Da) (LINDON et al., 2007; YAP, 2011).

O metaboloma é o conjunto das substâncias de baixo peso molecular presentes em uma célula com as funções de crescimento, manutenção e funcionamento (DUNN; ELLIS, 2005). A metabolômica fornece uma visão dos metabólitos de um sistema (LIN et al., 2006).

Os números de metabólitos em uma célula são bem menores que os números de genes ou proteínas. Por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui mais de 6.000 genes e somente cerca de 600 metabólitos. O metaboloma humano possui 20 mil genes e aproximadamente 7.800 metabólitos. Os metabólitos são os produtos finais da expressão gênica e refletem a funcionalidade da célula. Outra

vantagem é que o custo das análises são menores quando comparadas com a transcriptômica ou proteômica (DUNN; ELLIS, 2005; WISHART et al., 2009).

Podem ser feitas diferentes abordagens para as análises do metaboloma, entre elas, análises de metabólitos alvo, perfil de metabólitos (*metabolic profiling*), metabonômica global e assinaturas metabólicas (*metabolic fingerprinting*) (FIEHN, 2002). Entretanto, outros autores afirmam que do ponto de vista metodológico existem apenas duas estratégias: perfil de metabólitos e *metabolic fingerprinting* (DETTMER et al., 2007).

As análises dos metabólitos alvos são qualitativas e quantitativas geralmente relacionados a uma reação metabólica. Nas análises de perfil metabólico (*metabolic profiling*) são identificadas e quantificadas um número pré-definido de metabólitos que estão correlacionados a uma via metabólica.

Esta estratégia pode ser subdividida em duas outras chamadas de *metabolic fingerprinting* e *metabolic footprinting* (VILLAS-BÔAS et al., 2005). Na *metabolic fingerprinting* as análises são rápidas e fornecem a classificação das amostras, onde não existe identificação nem quantificação metabólica. Na *metabolic footprinting* o objetivo é focado na medição de todos os metabólitos extracelulares presentes em um meio de cultura (ALLEN et al., 2003; DUNN; ELLIS, 2005; DETTMER et al., 2007). Tanto numa quanto na outra, as análises podem ser utilizadas para distinguir os diferentes estados fisiopatológicos de uma célula (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

A metabolômica global é classificada como o estudo da detecção, identificação e quantificação de muitos metabólitos que possam ser usadas para as discriminar amostras (ISSAQ et al., 2009).

Existem diferentes aplicações incluindo melhoramento de plantas e avaliação da qualidade de culturas, avaliação e segurança alimentar, avaliação de toxicidade, avaliação nutricional, diagnóstico médico, avaliação do estado da doença e descoberta de biomarcadores (DUNN; ELLIS, 2005; MOCO et al., 2007). No campo do desenvolvimento de novos biomarcadores, a metabonômica apresentou sucesso do diagnóstico precoce em câncer renal (KIND et al., 2007), colorctal (RITCHIE et al., 2010), de pâncreas (URAYAMA et al., 2010).

2.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA APLICADA A ESTUDOS METABOLÔMICOS

Nos estudos em metabolômica foram feitas detecção de pequenas moléculas, incluindo ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos em biofluidos, provendo informação diagnóstica de diversas desordens metabólicas hereditárias. A cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (CG-EM) foi e ainda continua sendo usada devido ao seu baixo custo e grande eficiência de separação de compostos. Entretanto existem limitações como, por exemplo, o tipo e tamanho do metabólito que pode ser analisado além da necessidade de uma extensiva preparação de amostra (WANT et al., 2006).

Além da CG-EM, as técnicas analíticas de detecção mais utilizadas nas análises metabonômicas são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM) (GRIFFIN; SHOCKCOR, 2004).

A RMN é bastante utilizada para a caracterização de compostos e tem a vantagem de não utilizar etapas de pré-tratamento das amostras além de fornecer análises não destrutivas. Porém esta técnica apresenta algumas desvantagens como baixa sensibilidade e resolução que, somado a uma restrita faixa de concentração das amostras, resulta na detecção apenas de metabólitos de média a alta abundância (WANT et al., 2006).

A EM tem um papel fundamental na análise química de metabólitos devido a sua versatilidade, sensibilidade e especificidade (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

A combinação da EM com técnicas de separação como a cromatografia expande a capacidade seletiva de análise, pois permite a separação e a identificação dos metabólitos de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) (VILLAS-BÔAS et al., 2005; WANT et al., 2006; ISSAQ et al., 2009). Em particular a combinação da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (CLAE/ESI-EM), oferece a possibilidade de identificação e quantificação de uma ampla variedade de compostos polares, menos polares e neutros, mesmo em baixas concentrações, bem como possui uma excelente reprodutibilidade e sensibilidade permitindo, portanto, uma eficiente quantificação.

Uma das vantagens em se utilizar CLAE/ESI-EM em análises metabonômicas está na sua habilidade de determinar metabólitos com precisão em um curto espaço

de tempo com uma pequena quantidade de amostra (VILLAS-BÔAS et al., 2005; WANT et al., 2006).

A EM pode ser associada a três outros equipamentos: EM acoplada a cromatografia gasosa (CG-EM), análise de injeção em fluxo e espectrometria de massas sequencial (FIA-EM/EM) e EM acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência e EM sequencial (CLAE-EM/EM). Cada uma destas técnicas podem ser realizadas com equipamentos de diferentes graus de resolução, por exemplo, desde instrumentos quadrupolos até instrumentos de alta resolução como por exemplo o espectrômetro de massas com ionização por ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR-MS) e o Orbitrap (GRIFFITHS et al., 2010).

2.7.1 Amostras utilizadas em metabolômica

Nos estudos em metabolômica podem ser analisados diversos tipos de fluidos corporais. Estes contêm informações relacionadas ao estado de um organismo. Os mais empregados são a urina, o líquido cefalorraquidiano (LCR), o plasma e soro sanguíneos (DEKKER et al., 2007).

A amostra de urina é de fácil aquisição e pode ser usada para monitorar metabólitos, mas as variações entre os indivíduos reduzem a sua utilidade para os estudos metabolômicos. No caso do LCR a sua aquisição é invasiva e, portanto, indesejável para os estudos metabolômicos onde várias amostras são necessárias. O uso de plasma ou soro sanguíneo são mais adequados, e apesar da coleta ser menos invasiva quando comparado com o LCR, as proteínas e/ou fragmentos de proteínas fornecidos refletem as mudanças sistêmicas (WANT et al., 2006).

O plasma é a porção líquida do sangue com os fatores de coagulação na qual as células estão suspensas enquanto o soro é o fluido que permanece a partir do plasma após a coagulação das proteínas sem os fatores de coagulação. A vantagem de utilizar amostras de plasma é a presença de uma quantidade maior de proteínas. A desvantagem está na dificuldade em detectar as proteínas de baixa quantidade associadas a uma doença na presença de muitas outras proteínas (ZHANG et al., 2007).

A descoberta e identificação das proteínas presentes no sangue é uma tarefa difícil, já que 99% das proteínas são comuns no sangue. Resta apenas 1% que são excretadas pelas células e que estão envolvidas em respostas fisiológicas. Por este

motivo, o estudo de sistemas biológicos requer a utilização de ferramentas de alta sensibilidade como a espectrometria de massas (VEENSTRA et al., 2005).

Com relação ao preparo das amostras para análises de metabólitos depende basicamente do tipo da amostra e da estratégia empregada. Em muitas aplicações, não há necessidade de se isolar os metabólitos da matriz, porém em alguns casos as amostras necessitam de etapas de pré-tratamento como a precipitação das proteínas de alto peso molecular com solventes orgânicos (DUNN; ELLIS, 2005).

Existem diferentes métodos de precipitação de proteínas como a ultrafiltração por centrifugação, extração em fase sólida (EFS) utilizando colunas ou placas de disco e com solventes orgânicos. A ultrafiltração por centrifugação utiliza a força centrífuga para forçar um líquido contra uma membrana semi-permeável que possui um determinado tamanho de corte (10 a 50 kDa). Os sólidos suspensos e solutos de alto peso molecular permanecem retidos, enquanto os líquidos e solutos de baixo peso molecular atravessam a membrana. As vantagens desta técnica são rapidez, facilidade e baixo custo, porém existe uma grande chance de perder substâncias que estejam ligadas às proteínas de alto peso molecular (PAPM) (LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007).

A EFS que utiliza colunas pode realizar separação de analitos por meio de troca iônica, metal quelante, ligantes de afinidade, proteínas bacterianas, anticorpos ou combinação destes. Suas vantagens são alta seletividade e reprodutibilidade, no entanto o alto custo (principalmente as colunas de imunodepleção) e a baixa capacidade de amostragem tornam esta técnica menos utilizada. Os princípios químicos de exclusão da EFS que utiliza placas de discos são os mesmos das colunas (LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007).

A precipitação das PAPM com solventes orgânicos dissocia peptídeos e proteínas menores facilitando a sua extração, principalmente na presença de agentes pareadores de íons, como por exemplo, o ácido trifluoracético (TFA). A técnica é simples e fácil (DEKKER et al., 2007; LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007).

2.7.2 Interpretação dos dados metabolômicos

As análises metabolômicas resultam em uma grande quantidade de dados que são impossíveis de serem processados manualmente (ISSAQ et al., 2009). São utilizados programas de reconhecimento de padrões para tratar e interpretar a

grande quantidade de dados. Estes algoritmos reduzem a dimensionalidade dos dados permitindo classificar uma amostra através da identificação de padrões inerentes a um conjunto de amostras (ISSAQ et al., 2008).

Duas abordagens gerais para reconhecimento de padrões estão disponíveis: métodos supervisionados e não supervisionados. Ambas as abordagens podem ser aplicadas ao mesmo conjunto de dados para fins diferentes.

Métodos supervisionados requerem a formação de conjunto de dados em que o resultado é conhecido e utilizado para construir um modelo preditivo. Após a construção do modelo, este pode ser utilizado em um conjunto de testes para classificar amostras desconhecidas e medir a precisão preditiva do modelo. Estes métodos são bastante empregados para detectar diferenças sutis entre amostras similares, a fim de identificar potenciais candidatos a biomarcadores. Exemplos de técnicas supervisionadas de reconhecimento de padrões incluem o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e modelagem independente de analogias em classe (SIMCA). Outros como correção ortogonal de sinal (OSC) em programação genética e redes neurais também são utilizados (GOWDA et al., 2008).

Métodos não supervisionados estabelecem se existe ou não qualquer agrupamento intrínseco em um grupo de amostras e classificam os espectros sem a necessidade de um conhecimento prévio da classe biológica das espécies (como doentes e controles). Exemplos de métodos não supervisionados incluem métodos de agrupamentos hierárquicos (HCA) e PCA. O HCA visa definir agrupamentos naturais baseados na comparação de distâncias entre pares de amostras: pequenas distâncias entre as amostras implicam na semelhança metabólica entre elas representando propriedades fisiológicas semelhantes, hábitos alimentares ou graus e doenças. Os resultados são dispostos em forma de dendogramas que facilitam a visualização das diferentes categorias com um dado nível de similaridade.

O método de PCA caracteriza-se por gerar planos ortogonais e classificar as componentes principais (CPs) que explicam a variância dos dados (CLAUDINO et al., 2007). As CPs são um novo conjunto de valores descritores apresentadas como *scores* (relacionados com os agrupamentos e *outliers*) e *loadings* (relacionados com as variáveis que permitem as previsões de agrupamentos e *outliers*) (WANT et al., 2006).

Por este motivo, PCA vem sendo muito utilizado em análises de classificação de amostras biológicas tais como análise de soro, plasma e urina para a

discriminação entre grupos controles e pacientes com câncer oral, de pulmão e fígado, respectivamente (LOKHOV et al., 2012)

2.8 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise por componentes principais (PCA) é um dos métodos utilizados entre as técnicas multivariadas. O objetivo da PCA é descrever a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas CPs (SUMNER et al., 2003).

As medidas obtidas podem ser organizadas em uma tabela de dados (Matriz X), onde cada linha constitui uma observação (amostra) e as colunas representam as variáveis ou fatores medidos. Uma PCA faz com que seja possível fornecer um resumo de todas as observações ou amostras obtidas em uma tabela de dados. Além disso, os agrupamentos, tendências e amostras anômalas também podem ser encontrados.

O princípio da análise é a conversão dos dados multivariados presentes na tabela de dados em um modelo plano de projeção que aproxima todas as linhas (observações) da matriz X (TRYGG et al., 2007). Na PCA a dimensão dos dados originais é diminuída para um menor conjunto de dimensões chamadas de Componentes Principais (CPs), cuja principal característica é a ortogonalidade. Como vantagem, o novo conjunto de variáveis (CPs), concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação química (MATOS et al., 2003).

A maioria dos aplicativos disponíveis utiliza a técnica de decomposição do valor singular (SDV) para obter as CPs, sendo neste caso a primeira componente principal (CP1) definida na direção (eixo) de maior variância do conjunto de variáveis originais. De forma decrescente em termos de variação são definidas as demais componentes principais, porém estas serão sempre ortogonais a CP1 e entre si. Um modelo de PCA aproxima-se da variação de uma tabela de dados por meio de um modelo plano de baixa dimensão (TRYGG et al., 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de plasma sanguíneo foram obtidas no Centro de Especialidades Dr. Germano Traple, no município de Piraquara/PR. O projeto recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres humanos da Universidade Federal do Paraná sob o número CAAE 56177616.0.0000.0102. A estrutura do Centro possui médicos, enfermeiros fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais e técnicos de enfermagem. Esta equipe foi responsável pela triagem dos pacientes com diagnóstico clínico positivo para hanseníase. Após a consulta e coleta de baciloscopia os pacientes foram classificados segundo os critérios de Madri (1953) em tuberculóide, virchowiano e dimorfo. Os controles foram coletados dos acompanhantes dos pacientes que faziam curativos em feridas crônicas de pé diabético. De cada paciente foi retirada uma alíquota de cerca de 5 mL de sangue através de punção intravenosa em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram transportadas para o Centro de Estudos em Biofarmácia da Universidade Federal do Paraná (CEB-UFPR) em caixas de isopor contendo gelopack. Chegando ao laboratório elas foram centrifugadas para separação do plasma e alicotadas em tubos do tipo eppendorf e armazenadas em freezer a -40°C até a análise.

3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

No dia das análises as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Foi transferida uma alíquota da amostra, 50 μL para tubo do tipo eppendorf e precipitada com 100 μL de acetonitrila (ACN) com ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. Esta solução permaneceu em banho de gelo durante 5 minutos, seguida de agitação (Vortex-Genie 2T modelo SI T236) por 3 minutos e centrifugação (Eppendorf modelo 5810R) a 14.000 rpm/ 4°C durante 5 minutos. Com auxílio de uma micropipeta (Gilson modelo Pipetman Ultra), o sobrenadante foi transferido para tubo do tipo eppendorf e evaporado em concentrador de amostras (Centrivap, Labconco). As amostras foram reconstituídas em 50 μL de acetonitrila (ACN) com ácido Fórmico (AFO) 0,1%. Após o tratamento foi feita a análise em cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC ACQUITY) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo® G2 QTof, ambos da Waters Corporation.

3.2 ANÁLISES EM ESPECTROMETRO DE MASSAS

As separações cromatográficas foram executadas numa coluna de 100x2,1 mm ACQUITY™ 1,7 µm C₁₈ (Waters Corp., Milford, EUA) operando no UPLC ACQUITY acoplado ao espectrômetro de massas Xevo® G2 QTof, ambos da Waters Corporation. Foram ejetadas 2 µL das amostras na coluna a 40°C e eluídas com um gradiente bilinear de 0-5% (0-1 minutos) da fase A, 5-95% (1- 9 min) da fase B e de 9-12 min a coluna era condicionada ao retorno do estado inicial; A fase A consistia de água purificada (sistema Milli-Q®, Milipore) e ácido fórmico 0,1% e B em acetonitrila e ácido fórmico 0,1%. A duração da análise foi de 12 minutos a uma velocidade de fluxo de 0,5 mL / min.

De cada amostra foram feitas injeções em triplicatas intercaladas com a injeção de uma amostra de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (branco).

O gás de nebulização foi definido como 550L/h a uma temperatura de 200°C, o gás do cone para 50 L/h, e a temperatura da fonte definida para 110°C. A tensão do capilar e voltagem do cone foi definido para 3200 e 60V, respectivamente.

O espectrômetro de massas Xevo® G2 QTof foi operado com 17.000 de resolução no modo positivo. A taxa de aquisição de dados foi ajustada a 0,1s, com um atraso inter-varredura 0,05s usando faixa dinâmica realce (DRE); os dados foram coletados por 12min. A energia de colisão foi programada para alternar entre 5 e 25 eV para cada varredura. Todas as análises foram adquiridas utilizando o lockspray de leucina-encefalina (*m/z* 556.2771) numa concentração de 300 pg/mL e taxa de fluxo de 20 µL/min para garantir a precisão e reprodutibilidade das corridas. Os dados foram coletados no modo centróide 100-950 *m/z*.

3.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados adquiridos foram submetidos às análises estatísticas incluindo análise por componentes principais (PCA) e análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS), utilizando PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvetor Research) operado no software Matlab 7.0.1® (Mathworks). Os gráficos de influências ou loadings, resultantes da PCA, foram analisados com o objetivo de identificar os sinais das massas moleculares (metabólitos) que mais contribuiriam para uma dada discriminação.

4 RESULTADOS

Neste trabalho foram utilizadas amostras de plasma de pacientes diagnosticado com hanseníase e que estavam em tratamento no Centro de Especialidades Dr. Germano Traple no município de Piraquara/PR. O objetivo do estudo foi identificar modificações no perfil metabólico destes pacientes com hanseníase quando comparados a um grupo controle.

TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS
CONTINUA

Amostra	Sexo	Idade	Forma Clínica
151	Masculino	63	Tuberculóide
083	Feminino	43	Tuberculóide
102	Masculino	37	Tuberculóide
100	Feminino	37	Tuberculóide
108	Feminino	19	Tuberculóide
126	Feminino	27	Tuberculóide
068	Masculino	60	Tuberculóide
142	Masculino	69	Tuberculóide
181	Feminino	21	Tuberculóide
156	Feminino	58	Tuberculóide
134	Masculino	19	Tuberculóide
067	Masculino	45	Tuberculóide
031	Feminino	24	Tuberculóide
190	Feminino	54	Tuberculóide
030	Feminino	41	Tuberculóide
129	Masculino	40	Virchowiano
131	Masculino	49	Virchowiano
071	Masculino	35	Virchowiano
026	Feminino	44	Virchowiano
143	Masculino	44	Virchowiano
020	Masculino	33	Virchowiano
120	Masculino	58	Virchowiano
021	Masculino	44	Virchowiano
063	Feminino	57	Virchowiano
130	Masculino	39	Virchowiano
065	Masculino	49	Virchowiano
146	Feminino	32	Virchowiano
092	Feminino	47	Virchowiano
099	Masculino	36	Virchowiano
013	Masculino	58	Virchowiano
029	Feminino	37	Dimorfo
006	Masculino	26	Dimorfo
002	Masculino	58	Dimorfo
010	Feminino	40	Dimorfo
012	Feminino	27	Dimorfo
007	Feminino	57	Dimorfo
011	Masculino	43	Dimorfo
009	Feminino	56	Dimorfo
014	Masculino	40	Dimorfo
008	Feminino	41	Dimorfo

Amostra	Sexo	Idade	Forma Clínica
017	Feminino	49	Dimorfo
004	Feminino	59	Dimorfo
001	Feminino	49	Dimorfo
003	Feminino	40	Dimorfo
005	Masculino	57	Dimorfo

FONTE: o autor, 2016

O plasma humano contém uma variedade de compostos o que o torna uma matriz biológica altamente complexa. O tratamento das amostras é essencial uma vez que, além dos metabólitos de interesse, também há uma grande quantidade de interferentes. Como exemplo, a dinâmica faixa de concentração de proteínas de alto peso molecular (PAPM) presente nas amostras de plasma torna a detecção das moléculas de baixo peso molecular bastante dificultada. Geralmente em estudos de metabolômica as moléculas de baixo peso molecular são as de interesse e o tratamento das amostras são necessários para reduzir ou remover os interferentes das amostras (CHERTOV *et al.*, 2004; MROZINSKI *et al.*, 2004; ROSENBLATT *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005; DEKKER *et al.*, 2007).

As moléculas de alto peso molecular presentes em maior quantidade no plasma humano são a albumina e as imunoglobulinas, que representam mais de 60% das proteínas plasmáticas. A remoção destas proteínas auxilia o descobrimento e detecção de proteínas menos abundantes que podem revelar-se marcadores informativos de doenças (CHEN *et al.*, 2005). As proteínas de menor peso molecular podem estar complexadas as proteínas de alto peso como a albumina que é uma proteína carreadora do plasma. Existem diversos reagentes e protocolos utilizados atualmente que pré-fracionam e descartam as proteínas do soro de alta abundância, com a intenção de diminuir os seus efeitos de interferência.

No entanto, muitos ou a maioria dos biomarcadores também podem estar sendo descartados. A associação das moléculas de baixo peso com as proteínas transportadoras é esperada pois, caso não existisse esta associação, essas pequenas moléculas seriam filtradas pelos rins. Em estudos de modelagem são visíveis as afinidades entre os transportadores e os marcadores de pequeno porte por que o excesso de transportadores, como albumina e imunoglobulina garantem uma interação constante entre essas proteínas com aquelas (ROSENBLATT *et al.*, 2004).

É imprescindível que a extração das proteínas de alto peso molecular deva ocorrer em condições que diminuam a das moléculas e proteínas de baixo peso molecular (CHERTOV *et al.*, 2005).

A técnica mais utilizada é a precipitação das proteínas e existem diversos procedimentos para isso. Pode-se levar em conta a solubilidade que é um procedimento mais simples. A adição de acetonitrila em plasma, produz um “*pellet*” de proteínas, incluindo a albumina, enquanto que o sobrenadante se esgota nestas macromoléculas (VILLAR-GAREA; GRIESE; IMHOF, 2007). Vários foram os trabalhos que exploram o uso de acetonitrila para precipitar proteínas de alta abundância do plasma sanguíneo, supondo que em alguma concentração de acetonitrila o desejado grau de seletividade na solubilidade de grandes peptídeos e proteínas abundantes (incluindo os de baixo peso molecular) pudesse ser atingido (CHERTOV *et al.*, 2005). Sendo assim foi utilizada a solução de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA nos preparos das amostras.

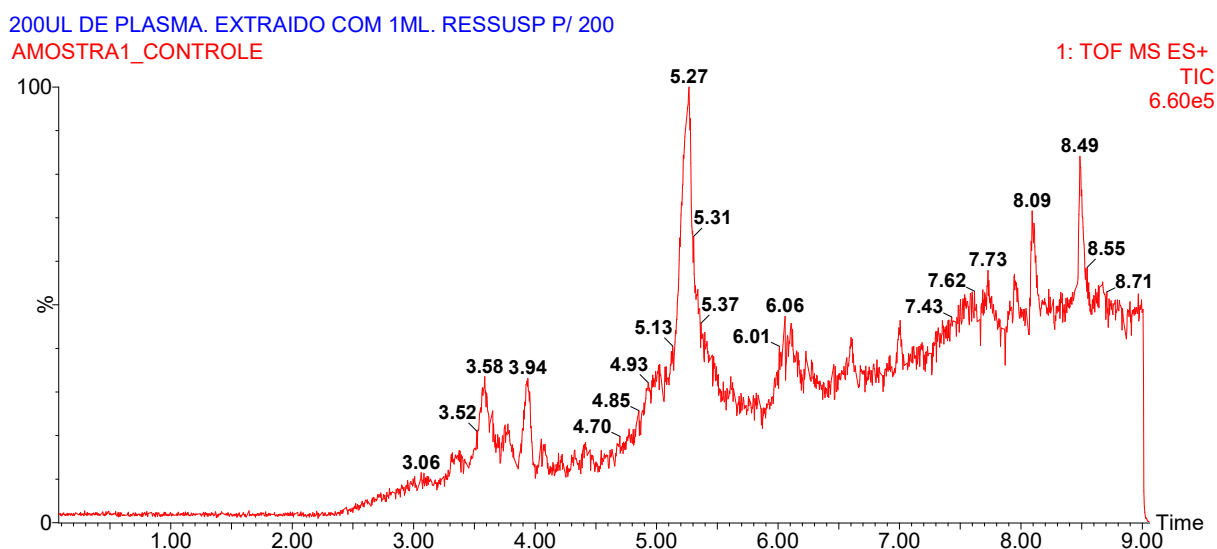
4.1 QUANTIDADE DE PLASMA UTILIZADO PARA AS ANÁLISES

Foram testados diferentes volumes de plasma e observados os resultados obtidos levando em consideração a relação da intensidade dos sinais em abundância relativa (%) e também a quantidade de íons detectados na faixa analisada (100-950 Da) durante a corrida cromatográfica.

Os volumes das amostras que foram testadas foram de 200 µL, 100 µL, 50 µL de plasma sanguíneo. As alíquotas foram tratadas conforme descrito no item 3.1 e os cromatogramas avaliados. É possível observar que as amostras que partiram tanto de 200 µL (figura 3) quanto de 100 µL de plasma (figura 4), precipitadas com acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA e ressuspendidas em acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (v/v), forneceram um bom resultado quando analisados os parâmetros de intensidade de sinal e quantidade de íons presentes na corrida cromatográfica. Porém quando analisado as regiões dos cromatogramas verificou-se que muitos íons estavam saturados devido a grande concentração destes no plasma. Sendo assim a quantificação não teria uma boa precisão podendo prejudicar a fase de análise das intensidades das massas. Utilizando 50 µL de plasma (Figura 5) foi possível observar a maioria dos sinais que estão presentes nas amostras que partiram de 200 µL e 100 µL de plasma com diminuição das intensidades de alguns

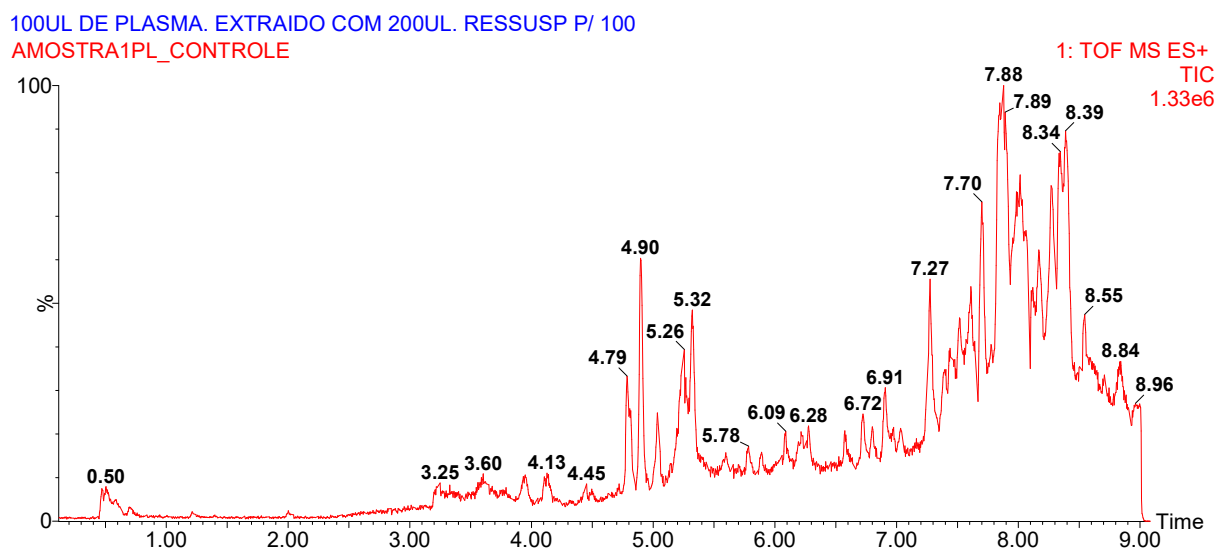
picos e não gerando saturação dos sinais. Portanto, a utilização de 50 μL foi considerada um resultado satisfatório, pois não influenciou a quantidade de sinais detectados e ainda as suas intensidades permaneceram elevadas sem saturação dos íons detectados.

FIGURA 3 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 10 μL DA SOLUÇÃO DE 200 μL DE PLASMA PRECIPITADO COM 1 ML DE ACETONITRILA/ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO 0,1% (V/V) E RESUSPENDIDO COM 200 μL DE ACETONITRILA/ACIDO FÓRMICO 0,1% (V/V).



FONTE: o autor (2016).

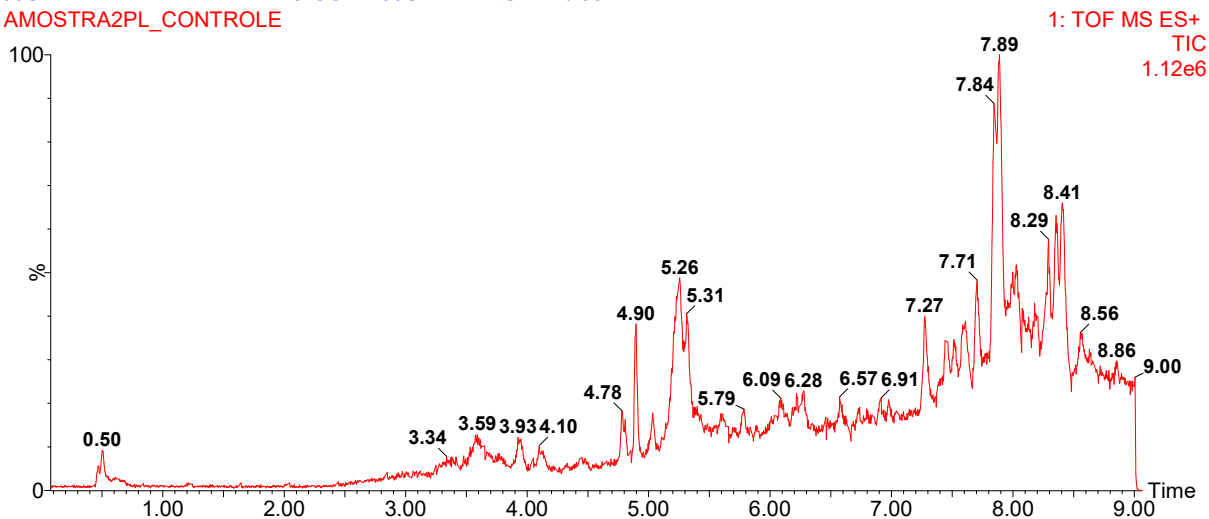
FIGURA 4 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 10 μL DA SOLUÇÃO DE 100 μL DE PLASMA PRECIPITADO COM 200 μL DE ACETONITRILA/ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO 0,1% (V/V) E RESUSPENDIDO COM 100 μL DE ACETONITRILA/ACIDO FÓRMICO 0,1% (V/V)



FONTE: o autor (2016).

FIGURA 5 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 10 μL DA SOLUÇÃO DE 50 μL DE PLASMA PRECIPITADO COM 200 μL DE ACETONITRILA/ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO 0,1% (V/V) E RESUSPENDIDO COM 50 μL DE ACETONITRILA/ACIDO FÓRMICO 0,1% (V/V)

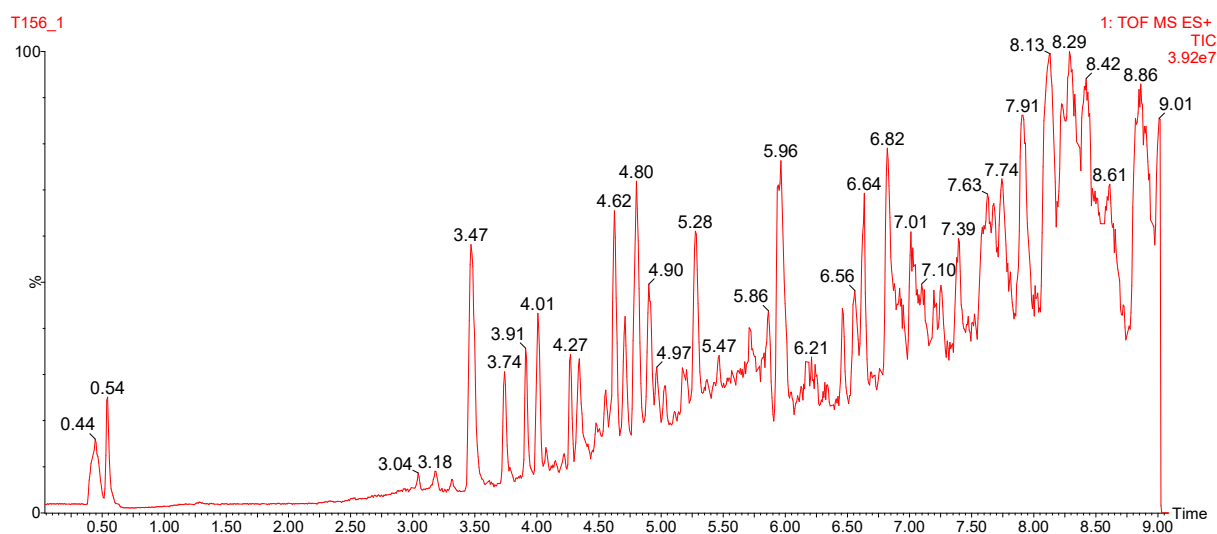
50UL DE PLASMA. EXTRAIDO COM 200UL. RESSUSP P/ 50
AMOSTRA2PL_CONTROL



FONTE: o autor (2016).

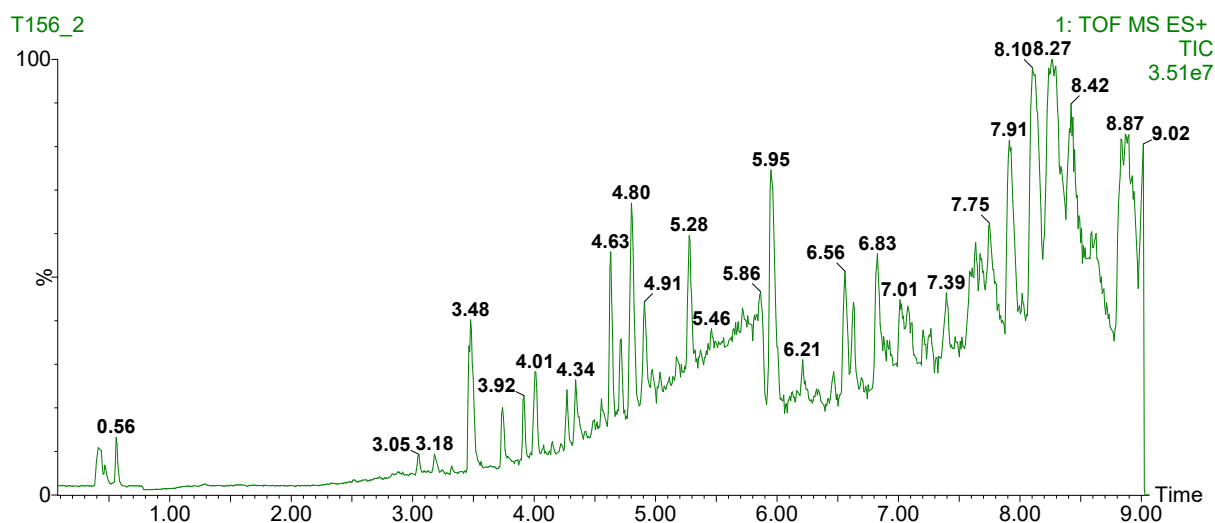
Também foi testado se o volume a ser injetado de cada amostra alteraria a relação da intensidade do sinal em abundância relativa (%) e também em relação a quantidade de íons detectados na faixa analisada (100-950 Da) durante a corrida cromatográfica. Para isso foi testada as injeções de 5 μL (figura 6) e 2 μL (figura 7) de plasma preparado conforme descrito no item 4.1.

FIGURA 6 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 5 μL DE PLASMA DE PACIENTE COM HANSENÍASE.



FONTE: o autor (2016).

FIGURA 7 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 μ L DE PLASMA DE PACIENTE COM HANSENÍASE

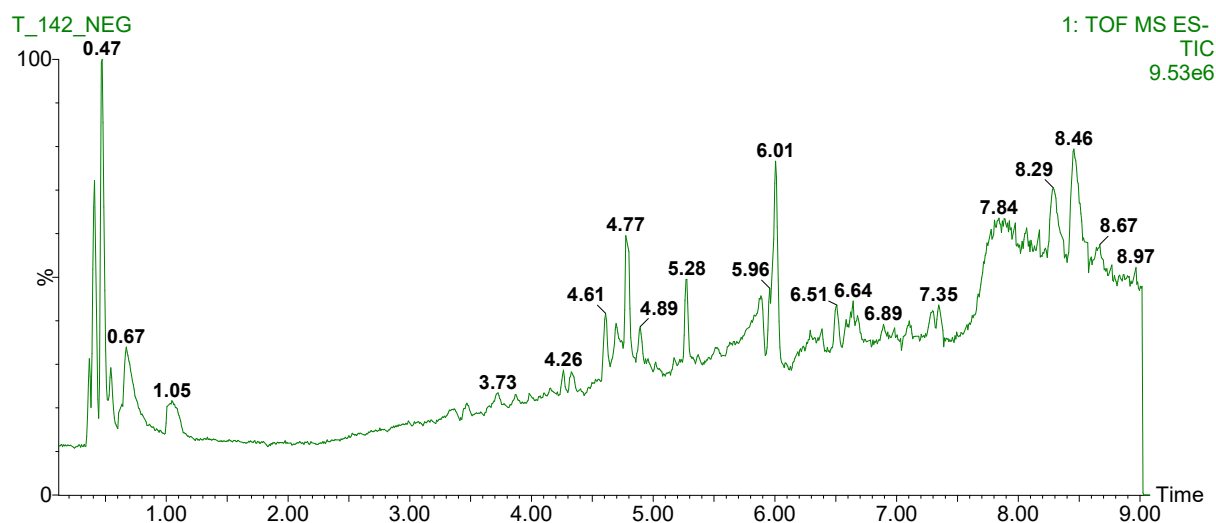


FONTE: o autor (2016).

Foi constatado que com os volumes de 2 μ L e 5 μ L de plasma não alterou significativamente as intensidades das massas pois o espectrômetro de massas Xevo® G2 Qtof da Waters Corporation possui uma alta sensibilidade e é capaz de detectar uma substância com quantidades mínimas de amostra como 10^{-12} g ou 10^{-15} mol para um composto de massa de 1000 Da. Também tem uma grande sensibilidade pois identifica e quantifica uma substância em concentrações muito baixas (uma parte em 10^{12}) em misturas complexas como o plasma. Como a variação das intensidades dos sinais dos volumes de 2 μ L e 5 μ L foram poucos significativos optou-se por utilizar o volume de 2 μ L.

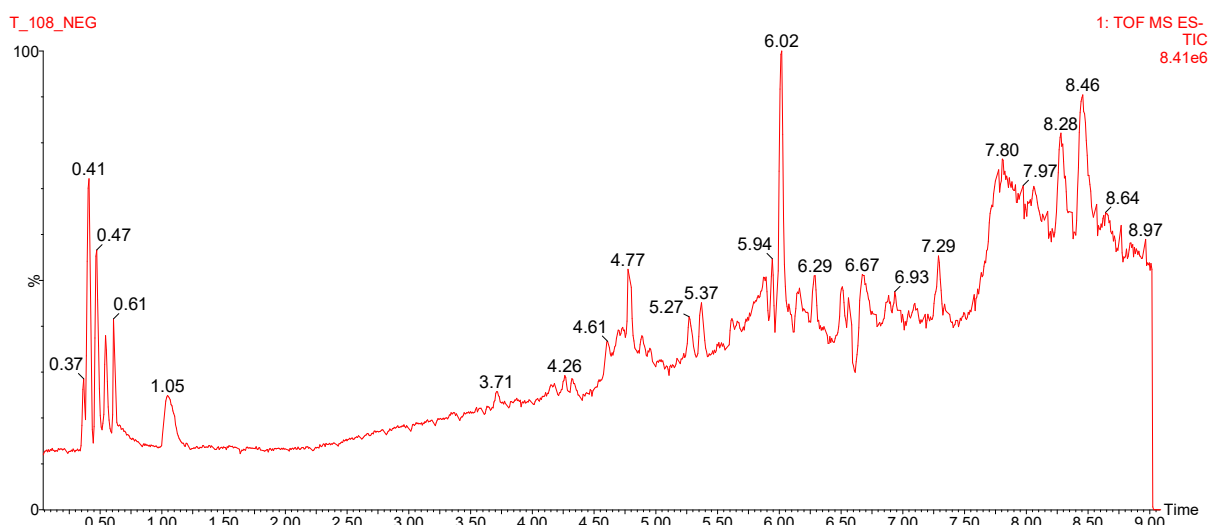
Foram feitas injeções no modo negativo (figura 8 e 9) para observar se havia alguma alteração significativa no cromatograma quando comparado ao modo positivo.

FIGURA 8 - CROMATOGRAMA OBTIDO NO MODO NEGATIVO A PARTIR DA INJEÇÕES DE 10 μ L DE PLASMA.



FONTE: o autor (2016).

FIGURA 9 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MODO NEGATIVO A PARTIR DAS INJEÇÕES DE 10 μ L DE PLASMA.



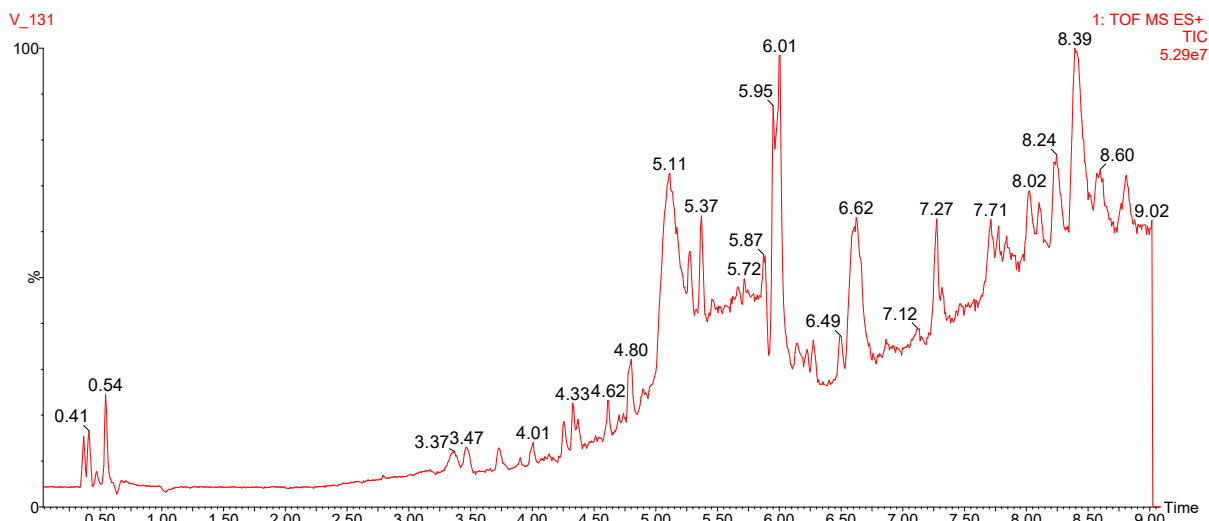
FONTE: o autor (2016).

Podemos observar nas figuras 8 e 9 que no modo negativo houve a supressão de vários sinais quando comparado ao modo positivo. As amostras foram processadas no modo positivo.

Também foram realizados testes para escolher a melhor solução para ressuspender as amostras antes da infusão no espectrômetro de massas. Após a evaporação da acetonitrila, que foi o solvente de precipitação das proteínas de alto

peso molecular, as amostras foram resuspendidas com a solução de acetonitrila/água/ácido fórmico (70:30:0,1) (v/v/v), conforme a figura 10.

Figura 10 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DA RESUSPENSÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA COM ACETONITRILA/ÁGUA/ÁCIDOFÓRMICO (70:30:0,1) (v/v/v)



FONTE: o autor (2016).

Constatou-se a supressão de vários sinais, então optou-se por resuspende somente com acetonitrila com ácido fórmico 0,1%.

4.2 PROCESSAMENTO DOS CROMATOGRAMAS ADQUIRIDOS PARA AS ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Após o tratamento das amostras para precipitação das proteínas de alto peso molecular, foram realizadas as análises das amostras controles e amostras experimentais.

Para cada amostra (grupo controle e grupo tuberculóide, grupo dimorfo e grupo virchowiano) foi feita injeção em triplicata e foi adquirido um espectro de massas. Aparentemente, os cromatogramas apresentaram o mesmo perfil conforme observado nas figuras 11, 12, 13 e 14.

FIGURA 11 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 µL DE PLASMA DE UM PACIENTE DO GRUPO TUBERCULOÍDE

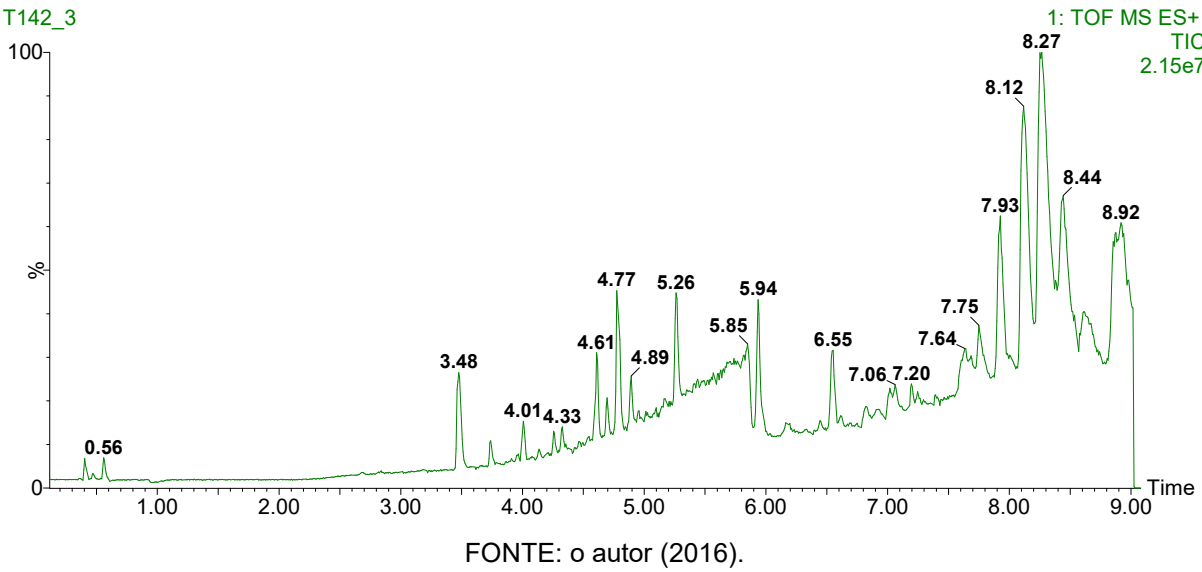


FIGURA 12 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 µL DE PLASMA DE UM PACINTE DO GRUPO VIRCHOWIANO

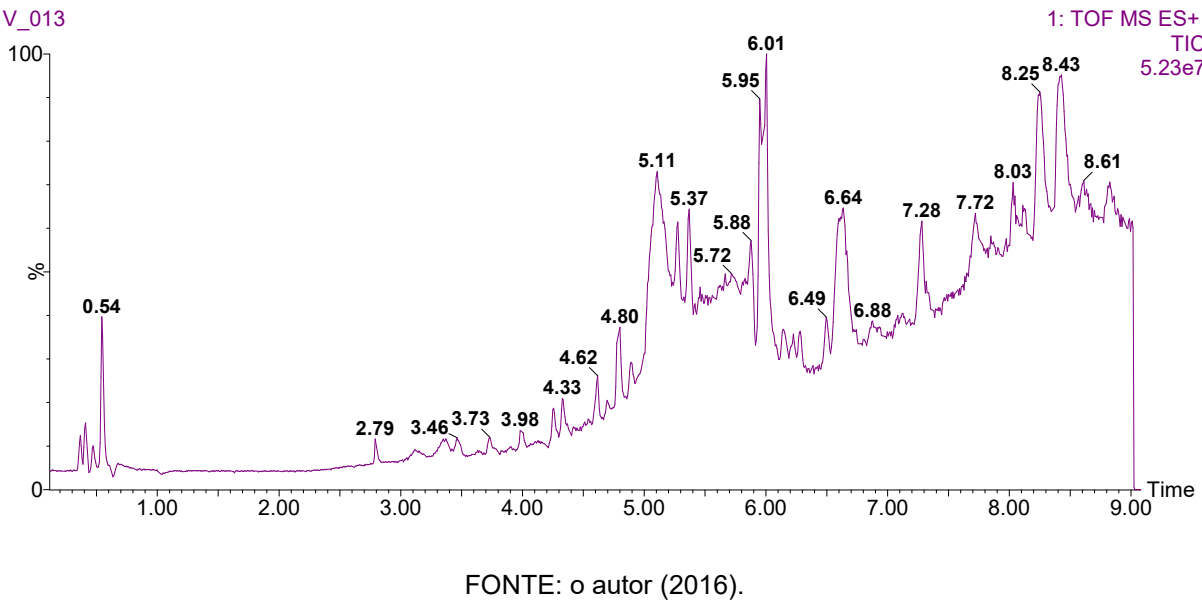
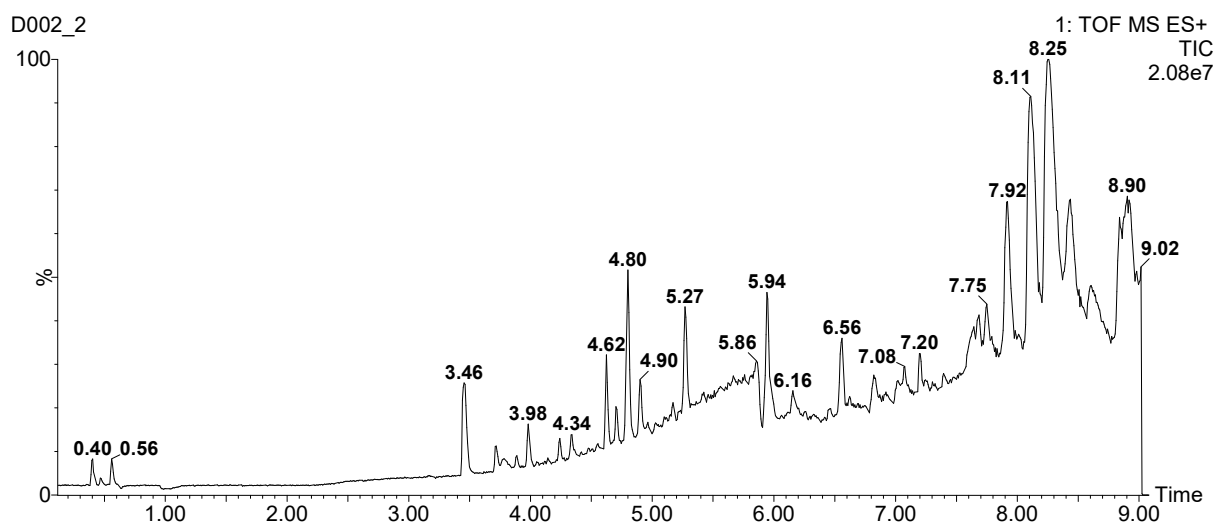
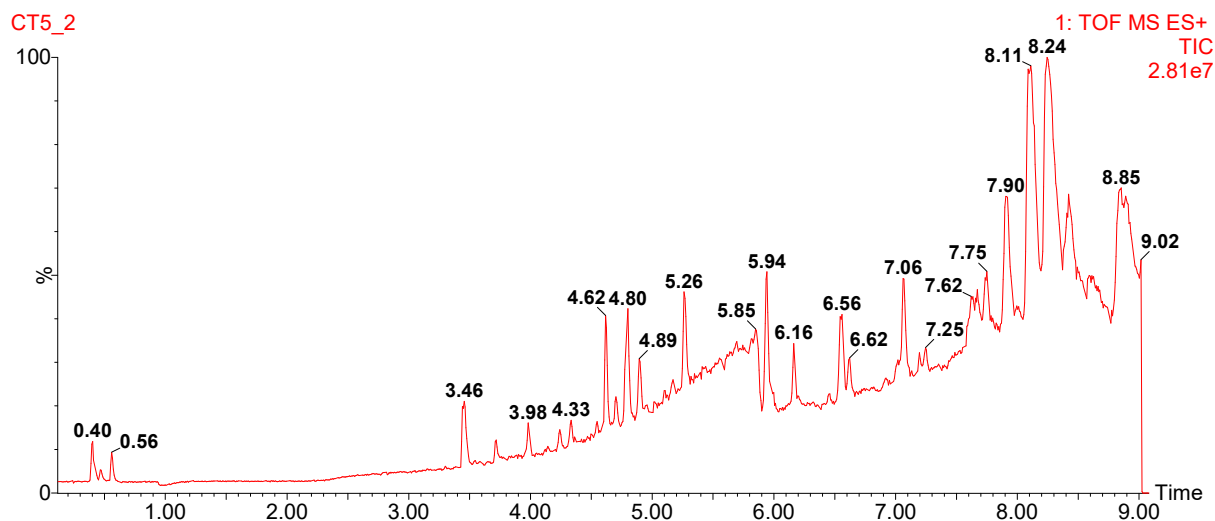


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 μ L DE PLASMA DE UM PACINTE DO GRUPO DIMORFO



FONTE: o autor (2016).

FIGURA 14 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA INJEÇÃO DE 2 μ L DE PLASMA DE UM PACINTE DO GRUPO CONTROLE

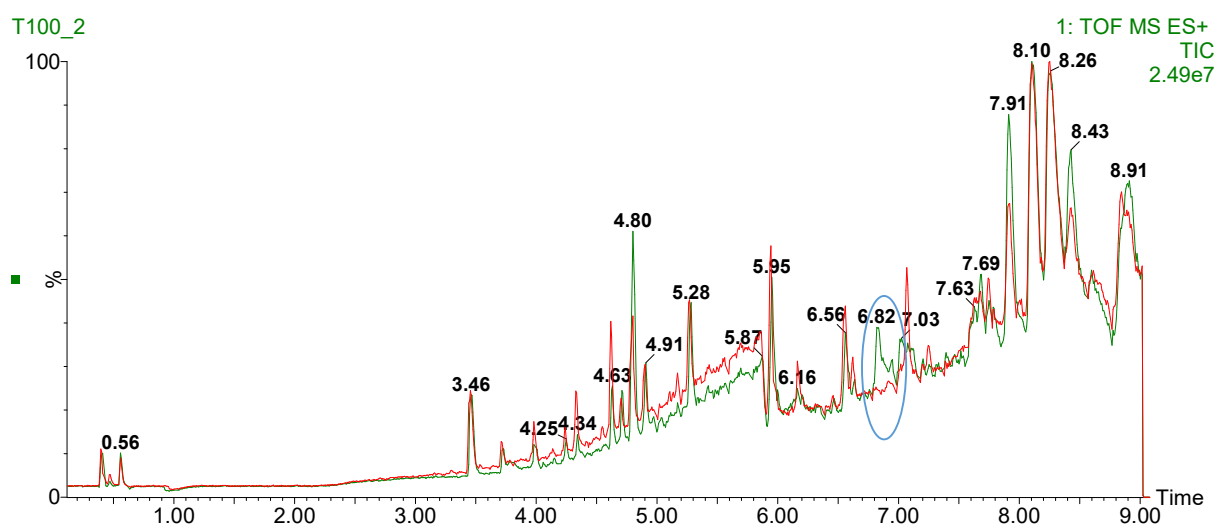


FONTE: o autor (2016).

A primeira etapa previamente às análises quimiométricas propriamente ditas, foi a subtração dos espectros de massas obtidos com os grupos experimental e controle daqueles obtidos com injeções de um branco (solução de acetonitrila e ácido fórmico 0,1%). Desta forma os sinais relacionados a aquela solução foram subtraídos não influenciando, portanto, a interpretação dos resultados.

As amostras foram separadas e corridas em três dias sendo que a cada dia foram efetuadas 60 corridas, sendo 15 de cada grupo com uma duração de 12 min para cada análise. Foram realizadas um total de 180 corridas, sendo que 7 corridas foram retiradas do estudo porque as massas dessas corridas não foram corrigidas pelo lockspray de leucina-encefalina. Os cromatogramas adquiridos foram então analisados para distinção entre o grupo controle e saudável. Foi feita a sobreposição de uma amostra controle e de uma amostra tuberculóide conforme figura 15.

FIGURA 15 - CROMATOGRAMA 0-9 MIN NORMALIZADO (BASELINE AT ZERO) PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO) E TUBERCULÓIDE (VERDE)

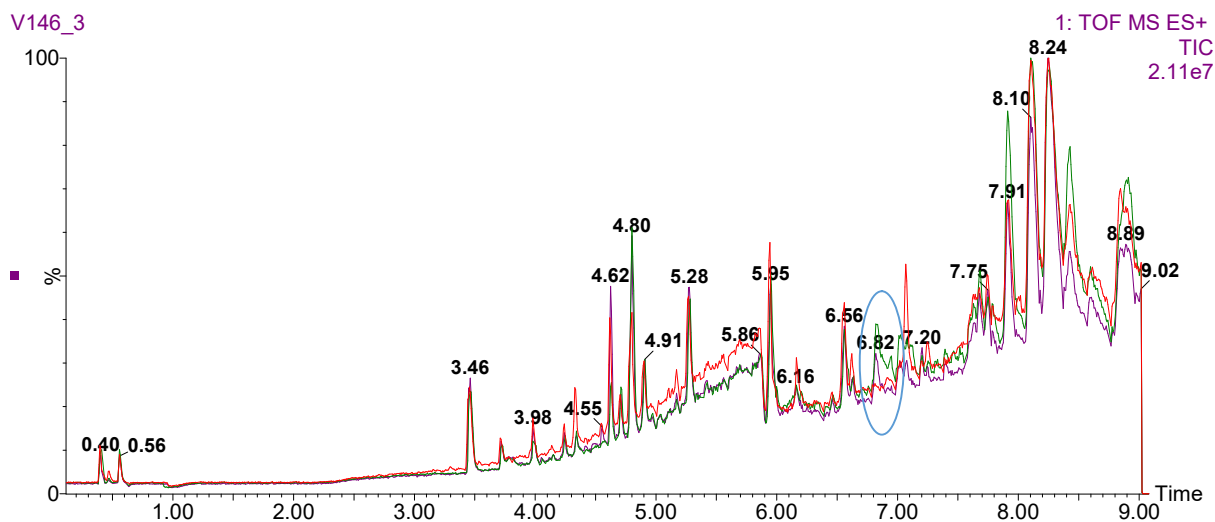


FONTE: o autor (2016).

Foi observado a presença de um pico na região entre 6.80 e 7.00 min na amostra do grupo tuberculóide, onde possivelmente haveria a discriminação entre as duas amostras. Nas outras regiões não foi observado diferença nesta primeira análise preliminar.

Adicionou-se neste mesmo comatograma uma amostra do grupo virchowiano e foi observada a presença do mesmo pico cromatográfico na mesma região de 6.80 e 7.00 da amostra do grupo tuberculóide conforme a figura 16.

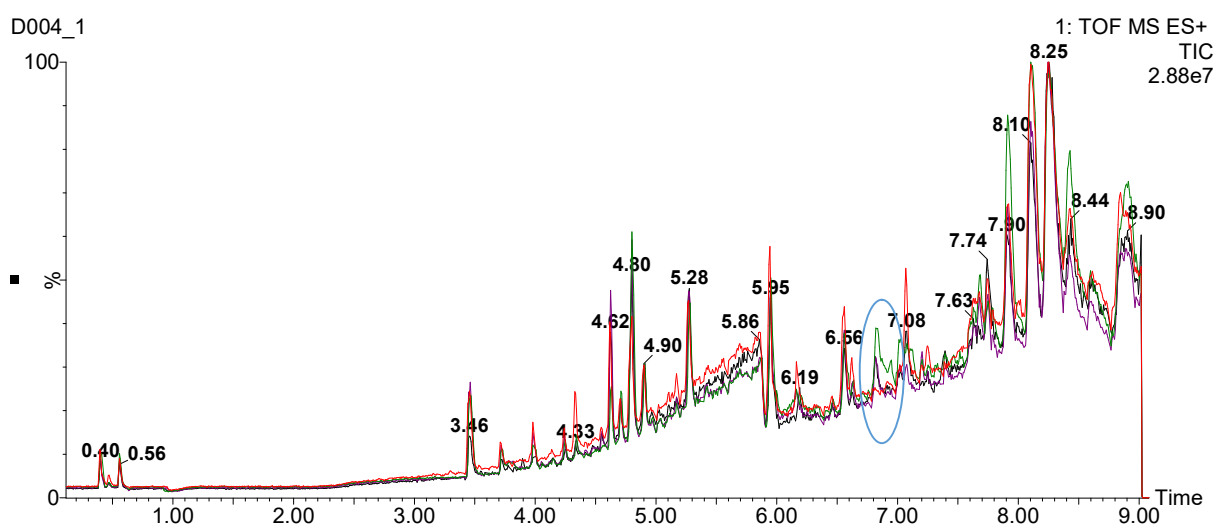
FIGURA 16 - CROMATOGRAMA 0-9 MIN NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO) E TUBERCULÓIDE (VERDE) E VIRCHOWIANO (VINHO)



FONTE: o autor (2016).

Por fim foi acrescentada a amostra do grupo dimorfo ao cromatograma e feita a mesma observação já citada entre a região de 6.80 a 7.00 min, conforme constatado na figura 17.

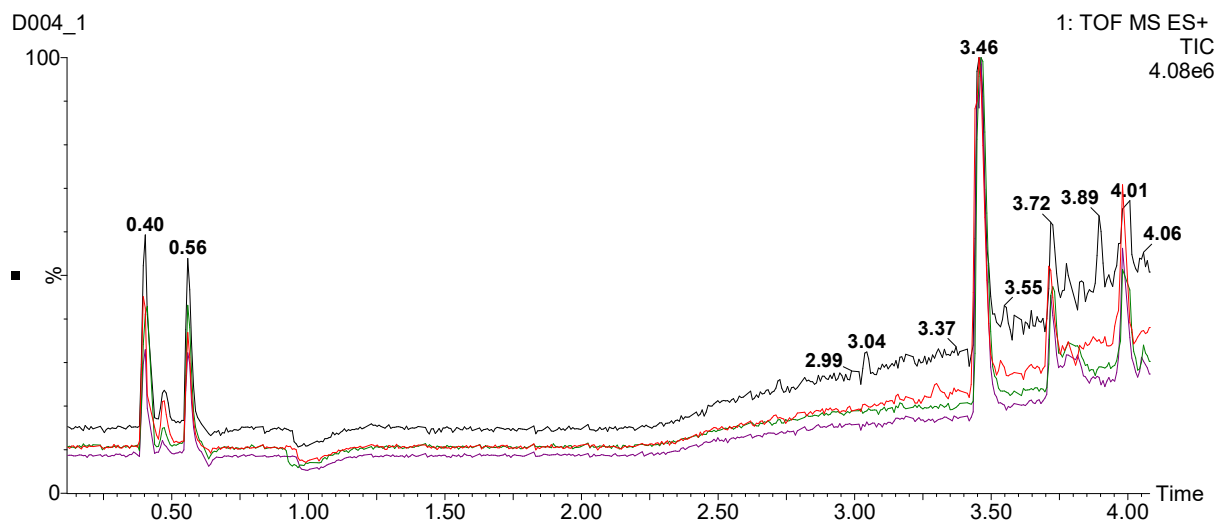
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA 0-9 MIN NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO)



FONTE: o autor (2016).

Em busca de outras alterações no cromatograma foi procedida a ampliação do cromatograma do tempo de 0 a 4 min conforme a figura 18:

Figura 18 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 0-4 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO)

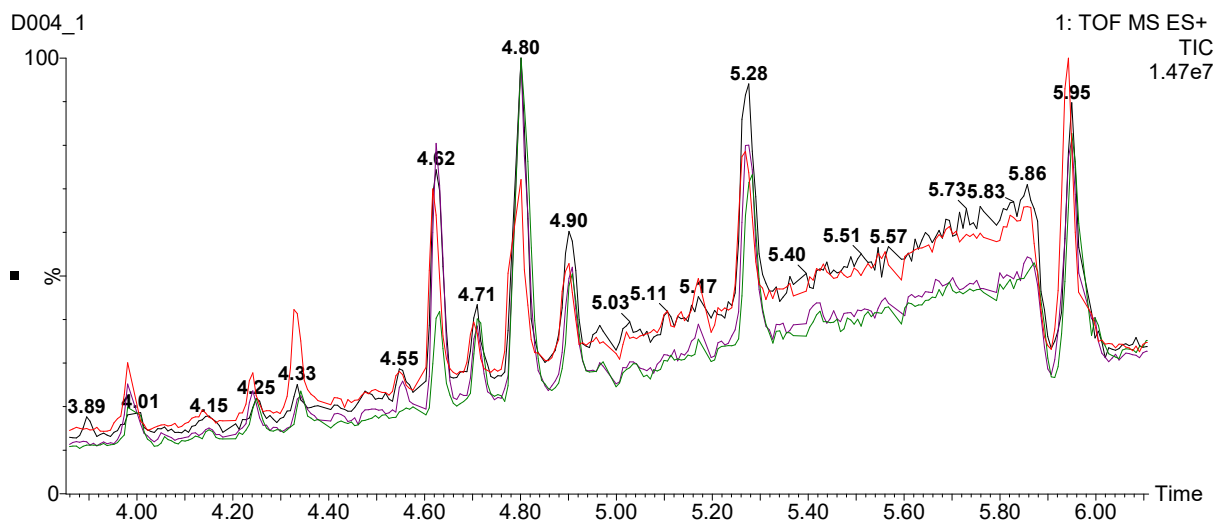


FONTE: o autor (2016).

Nesta faixa de tempo não foi possível a identificação de algum sinal diferente entre as amostras do grupo controle, tuberculóide, virchowiano e dimorfo.

Do tempo 4 a 6 minutos também não houve nenhum sinal que se destaca-se entre as amostras conforme observado no cromatograma da figura 19.

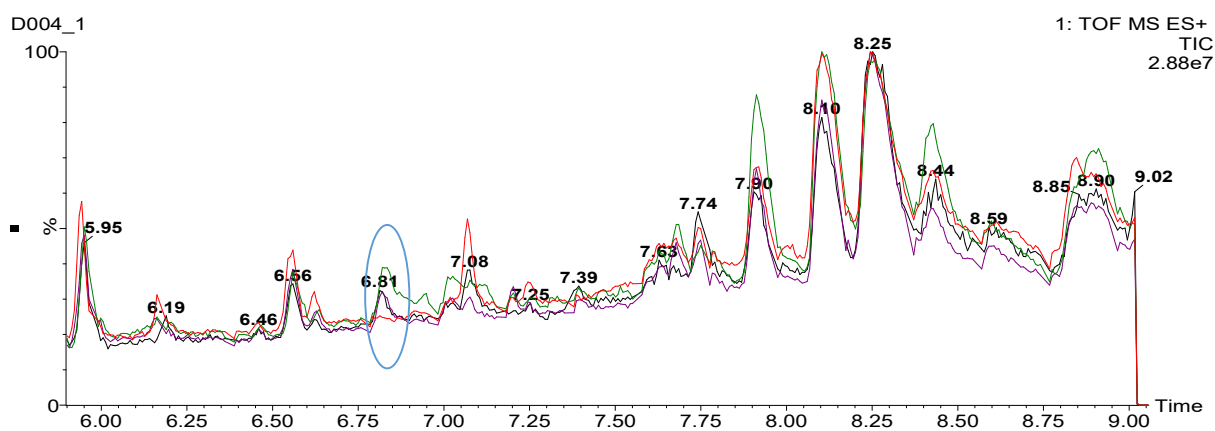
FIGURA 19- AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 4-6 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO)



FONTE: o autor (2016).

Por fim a ampliação entre 6 a 9 minutos foi possível observar que essa era a região com maior variabilidade entre os sinais e que nesta faixa de tempo poderiam estar os biomarcadores que seriam capazes de fazer a discriminação entre os grupos controle e doentes conforme a figura 20.

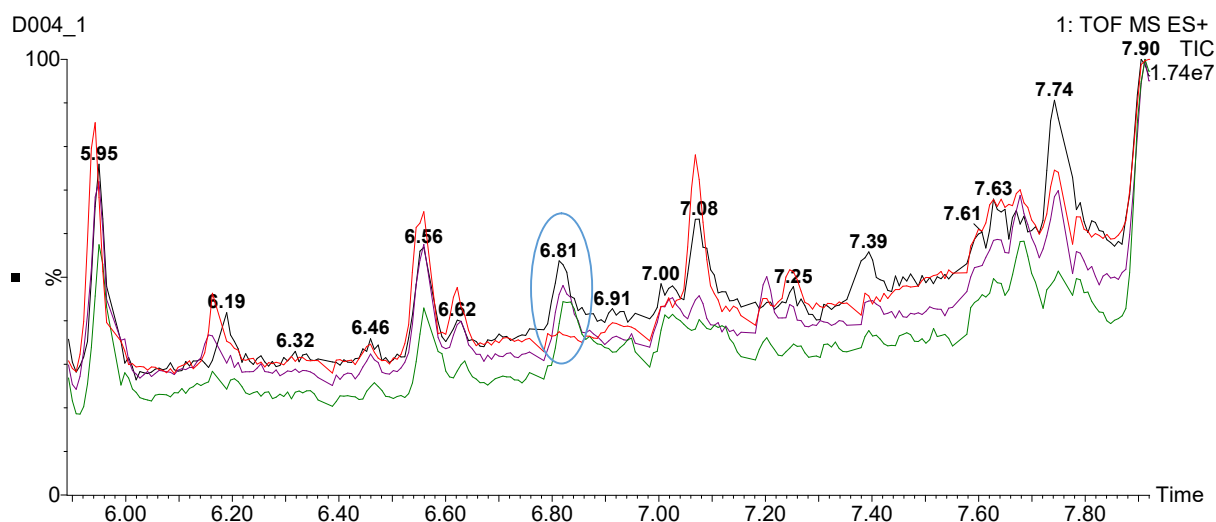
FIGURA 20 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-9 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO)



FONTE: o autor (2016).

Para melhor destaque foi restringido o tempo de 6 a 8 min conforme a figura 21, pois após esse tempo não percebe-se nenhuma variação significativa.

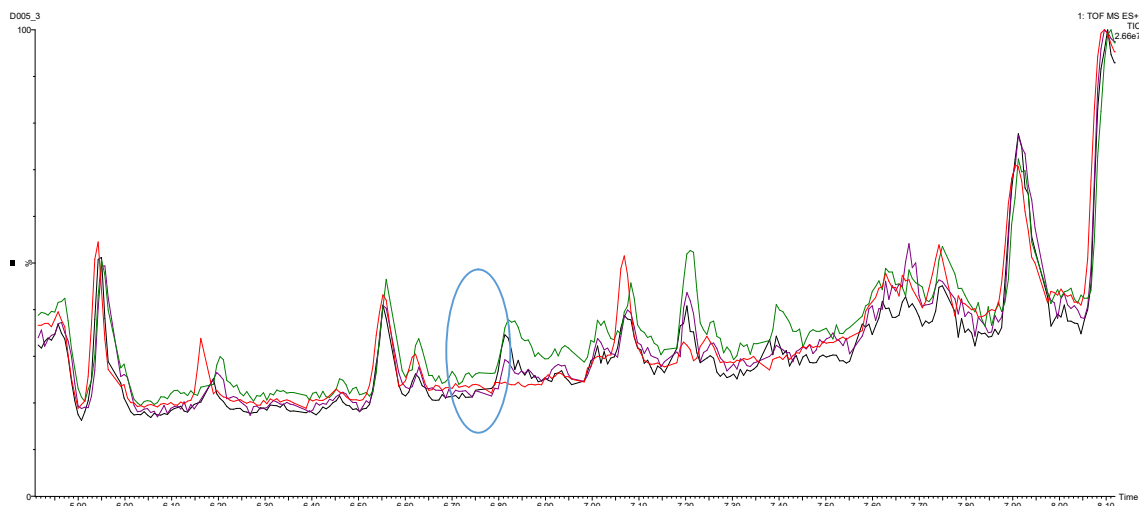
FIGURA 21 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHORVIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO) DO PRIMEIRO DIA DE EXPERIMENTO



FONTE: o autor (2016).

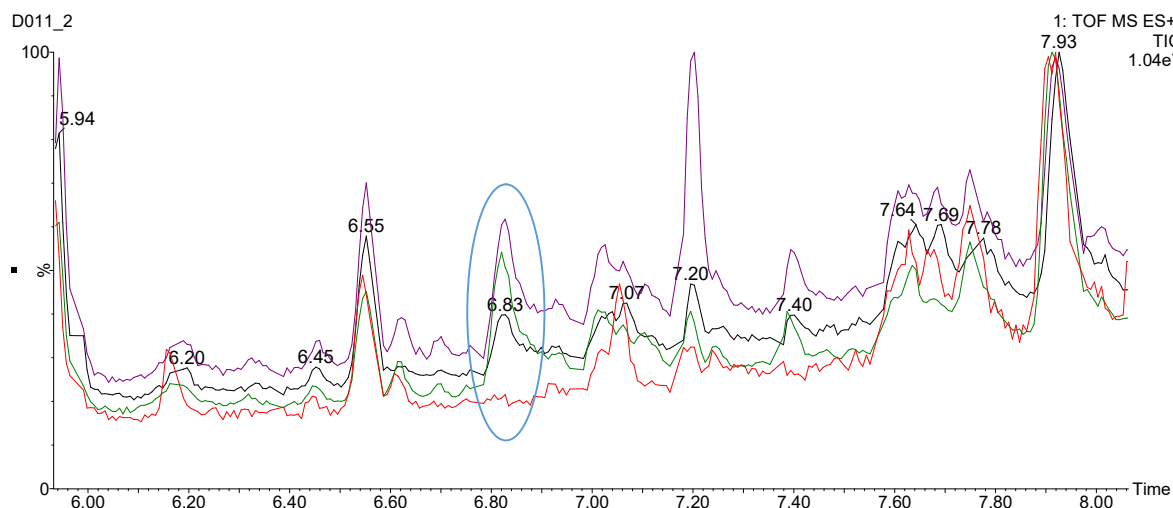
Foi procedida a mesma análise nas amostras do segundo dia de experimento (figura 22) e terceiro dia (figura 23) de experimento. Ficou evidente que as alterações observadas no primeiro dia de experimento foi reproduzido nos dias seguintes levando a constatação de um padrão nos cromatogramas no referido tempo de retenção (6-8 min).

FIGURA 22 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO) DO SEGUNDO DIA DE EXPERIMENTO



FONTE: o autor (2016).

FIGURA 23 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA NORMALIZADO PARA CORREÇÃO DA LINHA DE BASE ENTRE AMOSTRA CONTROLE(VERMELHO), TUBERCULÓIDE (VERDE), VIRCHOWIANO (VINHO) E DIMORFO (PRETO) DO TERCEIRO DIA DE EXPERIMENTO



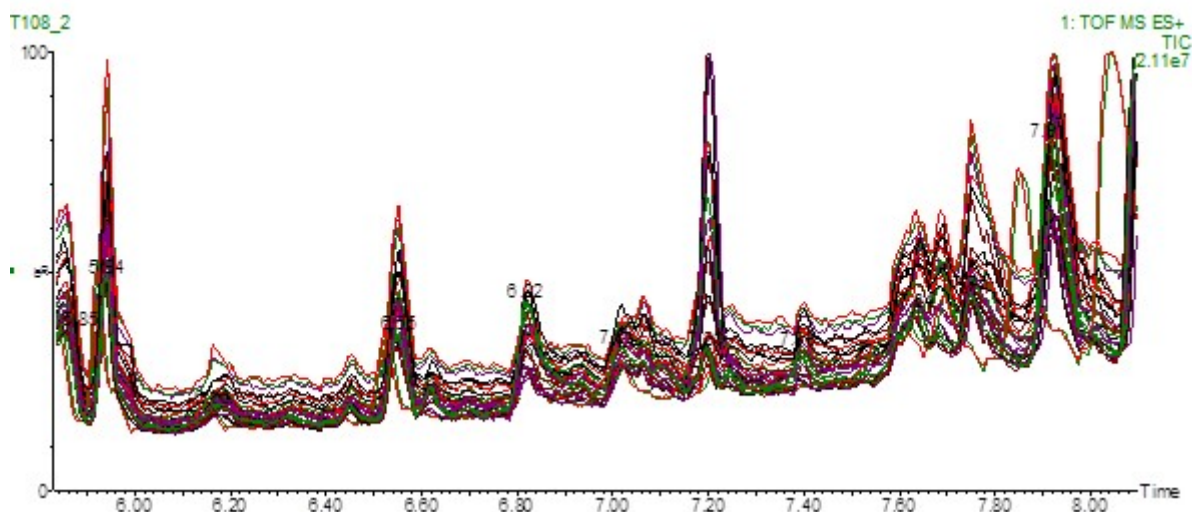
FONTE: o autor (2016).

Durante o tempo de análise foi feita a detecção de aproximadamente 26.000 sinais (m/z) em cada amostra. Isso é explicado devido a complexidade de análise do plasma já que neste líquido estão presentes praticamente todos os produtos e subprodutos excretados pelas células do organismo, moléculas exógenas, bem

como metabólitos de microorganismos que podem estar hospedando algum tecido do corpo como vírus, bactérias, protozoários, etc.

Para afastar estas possíveis variantes foram feitas as sobreposições das amostras que foram adquiridas em uma mesma corrida para observar se havia alguma tendência entre as amostras ou se essa variação era decorrente do estado de saúde. A primeira análise (figura 24) foi apenas com os grupos de pacientes doentes com as três formas clínicas da hanseníase (tuberculóide, virchowiana e dimorfa)

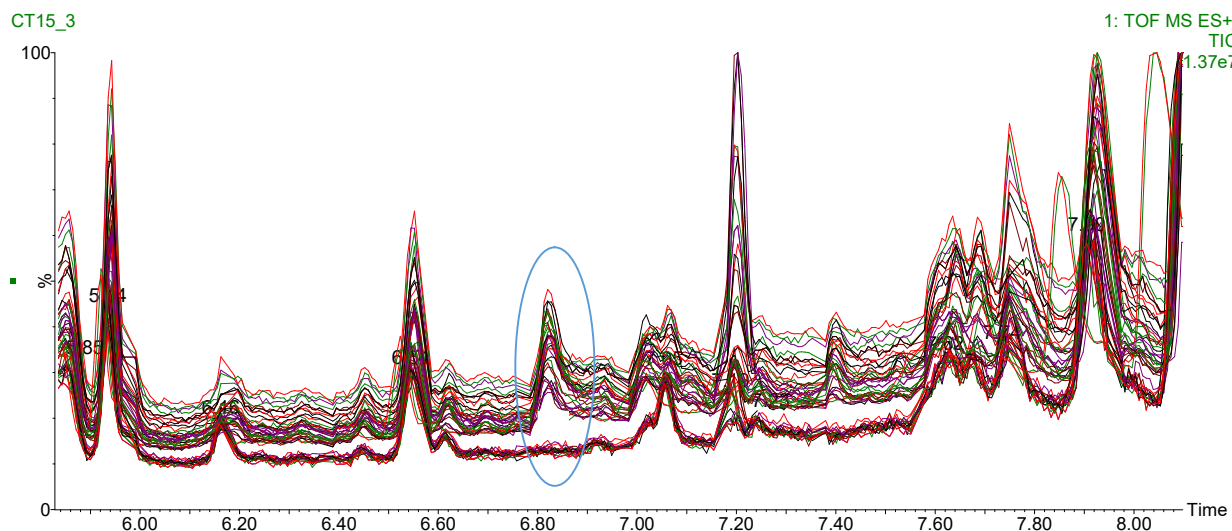
FIGURA 24 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA COM 45 AMOSTRAS DISTRIBUIDAS ENTRE OS GRUPOS TUBERCULÓIDE (15 AMOSTRAS), VIRCHOWIANO (15 AMOSTRAS) E DIMORFO (15 AMOSTRAS)



FONTE: o autor (2016).

Na segunda análise foram incluídas as amostras do grupo controle no cromatograma das amostras dos pacientes doentes como podemos observar na figura 25.

FIGURA 25 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6-8 MIN DO CROMATOGRAMA COM 60 AMOSTRAS DISTRIBUIDAS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE (15 AMOSTRAS), TUBERCULÓIDE (15 AMOSTRAS), VIRCHOWIANO (15 AMOSTRAS) E DIMORFO (15 AMOSTRAS)



FONTE: o autor (2016).

Os cromatogramas obtidos pelo software MassLynx™ da Waters Corporation foram tratados através do software MarkerLynx™ XS Application Manager que processa os dados multivariados complexos de LC / MS, LC / MS / MS, GC / MS e GC / MS / MS para estudos de metabolômica.

Os parâmetros de alinhamento e de detecção dos picos das amostras no software MarkerLynx™ XS foram os seguintes:

Analysis Type: A detecção dos picos foi seleccionada como o tipo de análise (Tipo 1), a fim de detectar os marcadores nas amostras.

Initial and Final Retention Time: observando os cromatogramas obtidos foi definido o intervalo de 6-8 minutos pois foi neste intervalo onde se encontrava a região de maior variância entre o grupo controle e doente.

Low and High Mass: a faixa de massa foi de 100 a 950 Da.

XIC Window(Da): limita a precisão de massa (Da) dos dados adquiridos. A tolerância recomendada é de duas vezes a massa de precisão do instrumento UPLC-HRMS que é de 0,01 Da. Seu valor foi configurado para 0,02 Da.

Use relative retention time: Esta opção utiliza um padrão interno para detectar todos os marcadores no que diz respeito ao tempo de retenção do padrão interno (ISTD). Como não utilizamos padrão interno esta opção não foi seleccionada.

Peak Width at 5% Height: Esta opção foi deixada como automático para o software determinar a largura do pico e integrar a área do pico. A largura foi fixada em 5% da altura do pico.

Peak-to-Peak Baseline Noise: o ruído da linha de base entre os picos afeta diretamente o número de marcadores detectados. Quanto maior seu valor menor será a quantidade de picos com baixa intensidade identificados já que a presença de um biomarcador com baixa intensidade pode ser confundido com um ruído. Este parâmetro foi automaticamente estimado pelo software.

Apply Smoothing: Esta opção especifica se o software aplicará alguma suavização durante a detecção dos picos. Nenhuma suavização foi aplicada para qualquer análise.

Marker Intensity threshold (counts): Este parâmetro é definido como o nível mínimo de intensidade para um pico espectral para ser considerado como um marcador. Um valor padrão de 100 foi recomendado por Waters Inc., de modo que os picos com intensidade inferior a 100 seria considerado como ruído.

Mass window: Esta opção define a tolerância de massa para que um marcador encontrado em uma amostra seja identificado como o mesmo nas demais amostras. Utilizou-se uma tolerância de 0,02 Da, uma vez que era o dobro da precisão de massa (0,01 Da) do aparelho.

Retention time window: É o tempo de retenção em minutos que indica se um marcador será considerado como o mesmo em todas as amostras. Uma janela de 0,2 minutos foi utilizada para todas as análises.

Noise elimination level: Esta opção permitiu que o software eliminasse automaticamente o ruído com base no valor inserido durante a detecção do pico. Um valor maior tende a descartar os picos com menor intensidade. Após vários testes foi definido um valor de 6.

Deisotope data: Esta opção remove os sinais dos compostos isótopos para evitar que os picos destes compostos sejam identificados como marcadores. Esta opção foi deixada desmarcada.

4.3 PROCESSAMENTO DOS BIOMARCADORES IDENTIFICADOS PELO SOFTWARE MARKERLYNX ATRÁVÉS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Depois de processadas todas as amostras no software MarkerLynx[™] XS os dados foram exportados em formato de tabela com extensão Comma-separated values (CSV).

Essa planilha final de dados foi transferida para uma planilha do software Origin Pro 8 e organizada de modo que para cada amostra fossem correlacionados os valores de m/z adquiridos com a intensidade máxima do sinal detectado (%). A utilização do software Origin Pro 8 foi em função do mesmo conter a extensão ASCII necessária para importar dados no software Matlab.

Em seguida, os dados foram transferidos para o software Matlab, realizando-se uma análise exploratória preliminar por meio de uma rotina de análise de componentes principais (PCA). Diferentes tipos de pré-processamento e número de componentes principais (CPs) foram avaliados, objetivando-se discriminar os conjuntos de amostras controle e experimentais. Em geral, podem ser realizados três tipos de pré-processamento (dados autoescalados, normalizados e centrados na média) e também analisar os dados sem nenhum tipo de pré-processamento.

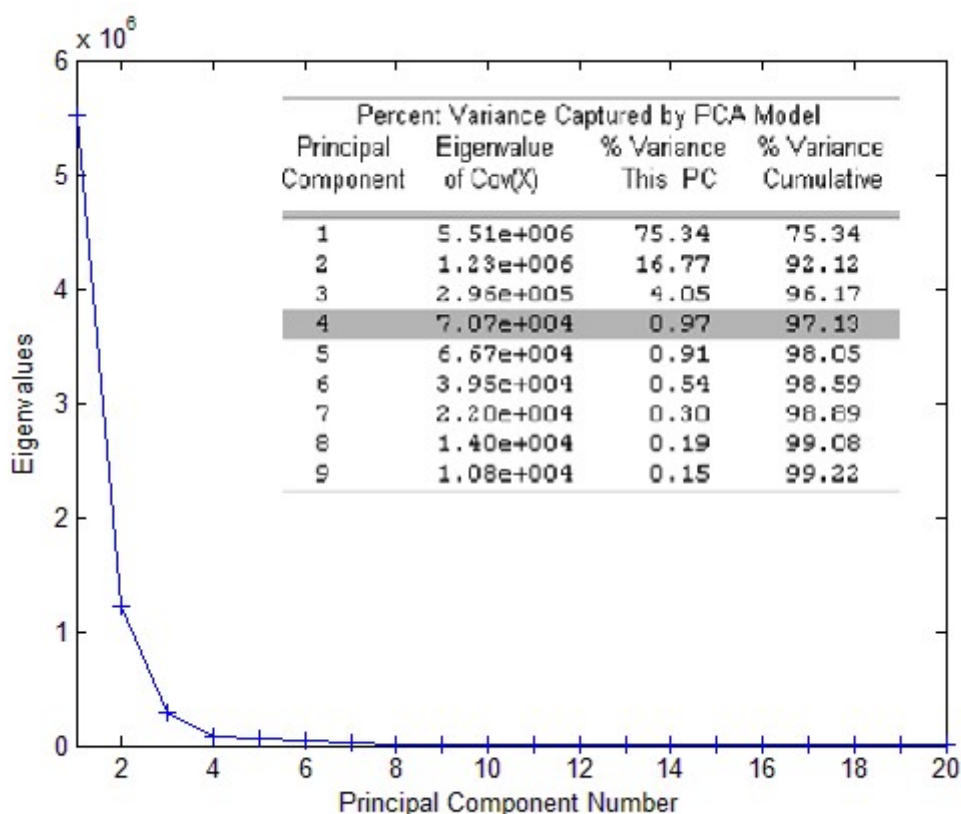
As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas por meio dos três pré-processamentos apresentados, porém, a melhor separação entre os grupos controle e experimental foi observada quando os dados não sofreram nenhum pré-processamento.

Uma vez que a redução da dimensionalidade da matriz é um dos objetivos em análises de PCA, a primeira análise a ser considerada antes dos gráficos de scores propriamente ditos é quantas componentes principais devem ser investigadas e quantas devem ser ignoradas. Para isso, existem alguns critérios: o primeiro é ignorar as CPs no ponto em que a próxima componente principal (CP) oferece pequeno aumento na variância acumulada explicada (Eigenvalues). Um segundo critério é incluir todas as CPs até uma porcentagem de variância total explicada pré-determinada, por exemplo 90%. Um terceiro critério é ignorar as CPs cuja variância explicada é inferior a 1% quando uma matriz de correlação é utilizada ou menos do que a variância média explicada quando uma matriz de covariância é utilizada, com a idéia de que tais componentes oferecem pouca informação. O quarto critério é

ignorar as últimas CPs cujos valores de variância explicada são praticamente iguais (FERREIRA et al., 1999).

Nos experimentos realizados neste trabalho, o número de CPs a serem investigadas foram escolhidos em função do gráfico de Eigenvalues versus número de CPs, ou seja, a partir de uma determinada componente não existe aumento significativo da variância total explicada, determinando, portanto, o número de CPs escolhidas. A Figura 26 mostra um exemplo da escolha do número de CPs quando analisado o gráfico de Eigenvalues para as amostras do grupo controle comparado com o grupo de doentes. Podemos observar que foram utilizadas 20 CPs para explicar a totalidade dos dados originais, porém, observa-se que a partir da quarta CP (CP4) não existe um acréscimo significativo na variância acumulada explicada, ou seja, com quatro CPs é possível explicar cerca de 97,13% da variância acumulada, enquanto que a partir da quinta CP (CP5) o aumento da variância acumulada é pouco significativo.

FIGURA 26 - GRAFICO DE EIGENVALUES



FONTE: o autor (2016).

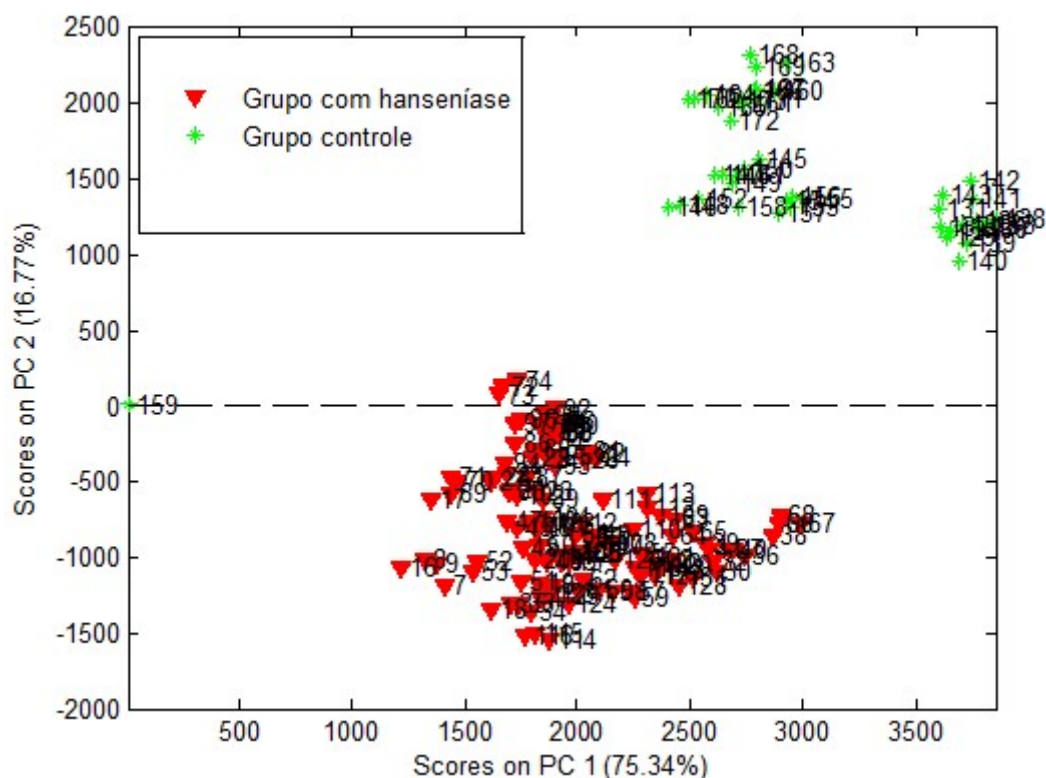
Com a definição do número de CPs a ser investigado, o próximo passo foi a construção dos gráficos de scores obtidos a partir dos espectros de massas dos grupos controle e de doentes.

4.3.1 Gráfico de scores dos grupos experimentais

O objetivo foi de observar as amostras no espaço dimensional reduzido e a possível diferenciação entre estes grupos: sadios e doentes. Quando os gráficos de scores são analisados, as observações devem ser realizadas em relação a distribuição das amostras no sistema de coordenadas (CPs) e em relação a quais CPs estão sendo analisadas, bem como o quanto da variação acumulada elas representam. Percebe-se que cada coordenada (CP) é traçada a partir do ponto zero e desta forma o gráfico fica dividido em dois quadrantes os quais ficam delimitados pelos valores positivos e negativos de cada CP.

As coordenadas de cada uma das amostras no espaço definido pelas CPs são denominadas de scores (FERREIRA et al., 1999), parâmetro útil para a avaliação de semelhanças e diferenças. Uma vez que os scores representam a disposição das amostras no novo sistema de coordenadas, fornecendo um resumo de todas as observações referentes às amostras e, ainda, apontando agrupamentos, tendências e amostras anômalas, a sua análise permite relacionar as amostras de forma que aquelas que estão próximas umas das outras possuem um perfil semelhante, enquanto aquelas que se distanciam possuem propriedades diferentes (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007).

FIGURA 27 - GRÁFICO DE SCORES DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS PACIENTES SADIOS E COM DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE



FONTE: o autor (2016).

Como observado na Figura 27, os pacientes com perfis semelhantes foram dispostos em grupos. Nota-se a formação de dois grupos sendo um o grupo dos pacientes com hanseníase (vermelho) e o outro o grupo controle (verde), sendo que a responsável por essa distinção foi a segunda componente principal (CP2).

Após as análises a amostra 159 foi considerada como outlier e foi retirada do estudo.

A primeira componente (CP1) explica 75,34% de toda a variância das amostras, porém ela não é capaz de efetuar a diferenciação entre os dois grupos (controle e doentes). A segunda componente (CP2) explica 16,77% da variância e é responsável pela discriminação entre o grupo controle e grupo experimental.

A detecção da hanseníase em pacientes assintomáticos é uma grande estratégia para interromper a propagação desta doença no Brasil e no mundo. Hoje o diagnóstico da hanseníase é clínico sendo complementado pela baciloscopia que, em alguns casos, pode não estar presente o bacilo (pacientes paucibacilares). Isso é devido ao período de incubação, de no mínimo 6 meses, para apresentar os

primeiros sinais da doença. Neste período a doença pode ser transmitida para pessoas do círculo familiar do doente.

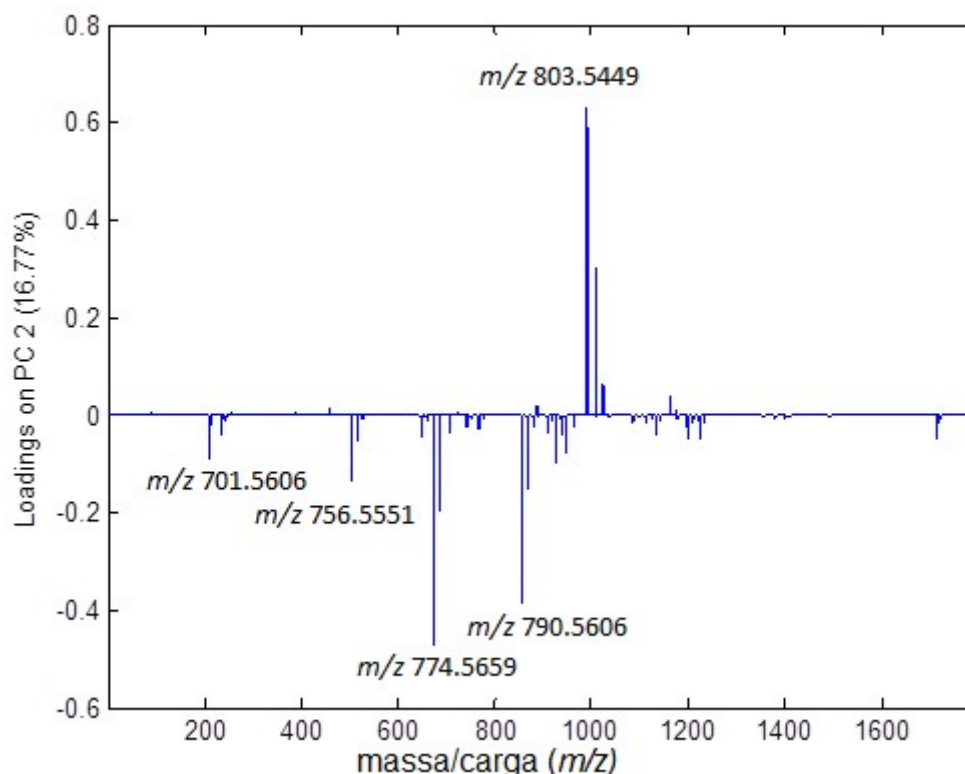
Conhecendo um biomarcador da hanseníase que seja específico poder-se-ia fazer um diagnóstico já no período de incubação da patologia.

4.3.2 Gráfico de influências (Loadings)

Após a análise dos gráficos de scores, foram construídos os gráficos de loadings de cada CP responsável pela diferenciação das amostras. O objetivo desta etapa foi avaliar a m/z que mais contribuiu para distinguir os grupos experimental e controle. Desta forma, os gráficos de loadings foram construídos em função da CP que permitiu a diferenciação entre os grupos, ou seja, para todas as amostras foi da segunda componente CP2.

Quando observado o gráfico de loadings de CP2 (Figura 28) de todas as amostras as m/z que mais contribuíram para separar as amostras controles, que estavam no lado positivo da componente, foram as m/z 803.5449 e as massas que distinguíram o grupo de doentes, que estavam do lado negativo da CP2, foram m/z 701.5606, 756.5551, 774.5659, 790.5606.

FIGURA 28 - GRÁFICO DE LOADINGS DOS GRUPOS



FONTE: o autor (2016).

4.4 ANÁLISE DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)

O princípio da análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) é a construção de um modelo linear que correlaciona dois grupos de dados. A primeira etapa da construção do modelo de calibração multivariada trata da aquisição de respostas instrumentais para uma série de amostras as quais são arranjadas em uma matriz X e os valores de referência da propriedade de interesse em um vetor y . Desta forma, os espectros de massas obtidos em um conjunto de experimentos (conjunto de calibração) foram utilizados para predizer novas observações (conjunto de validação) em relação a presença ou ausência da hanseníase nas amostras.

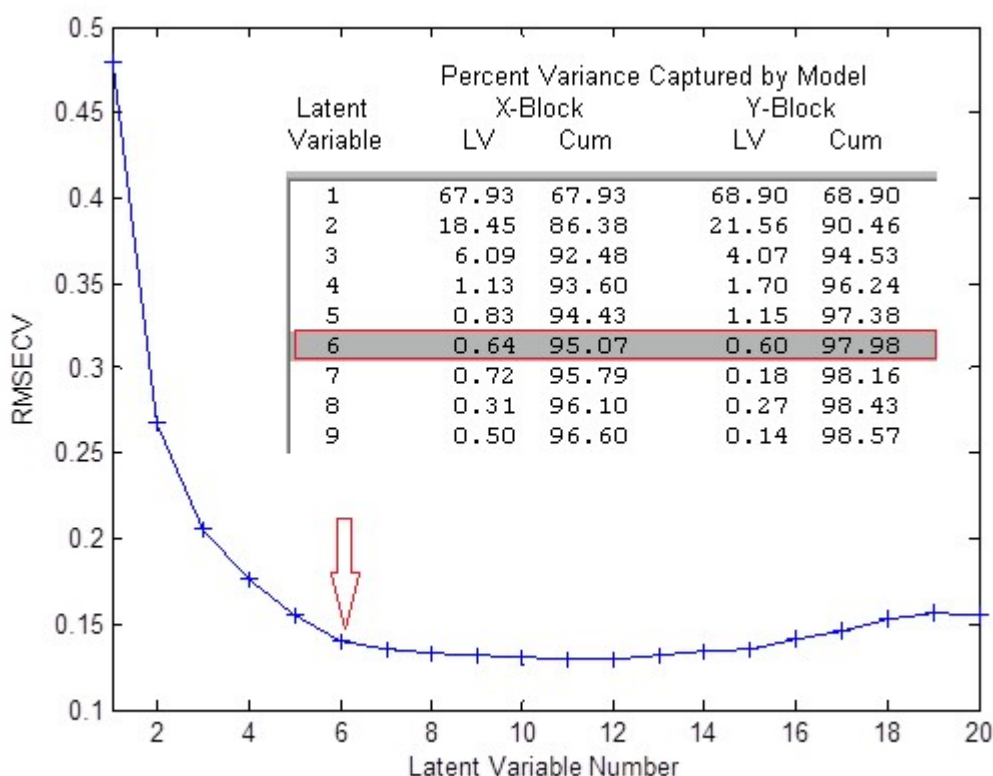
Para a construção do modelo de predição o conjunto de calibração (matriz X , $n = 148$) foi montado da seguinte forma: grupo controle ($n = 38$), grupo tuberculóide ($n = 36$), grupo virchowiano ($n = 36$) e grupo dimorfo ($n = 38$). Os dados da matriz X foram organizados de maneira que cada coluna representou uma amostra de plasma e cada linha os respectivos valores de intensidade máxima (%) para cada valor de m/z adquirido. O vetor y foi disposto de maneira que as amostras dos

pacientes diagnosticados com hanseníase receberam o valor 1 (um) e do grupo controle receberam o valor 0 (zero).

O conjunto de calibração foi analisado sem pré-processamento para a matriz X e para o vetor y, com regressão NIPLS e validação cruzada Venetian blinds.

Como realizado na PCA, inicialmente foi necessário verificar quantas CP, neste caso denominadas variáveis latentes (VL), devem ser analisadas para comporem o conjunto de calibração. Para isso, o gráfico da raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV) versus número de VL foi plotado e foram avaliados os dados de erros da validação cruzada, os quais devem ser os menores possíveis (Figura 29). Desta forma, 6 VL demonstraram baixos erros de validação cruzada e ainda foram capazes de explicar aproximadamente 95.07% da variância acumulada da matrix X e 97.98% da variância acumulada do vetor y.

FIGURA 29 - O GRÁFICO DA RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DA VALIDAÇÃO CRUZADA (RMSECV) VERSUS NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (VL)

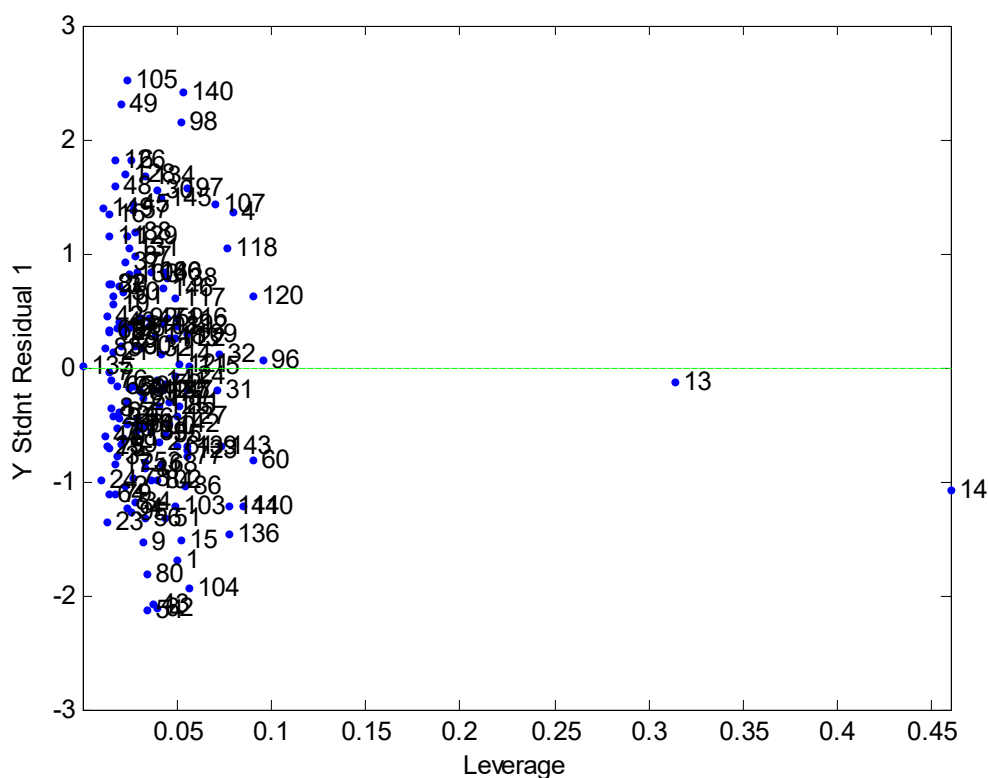


FONTE: o autor (2016).

Escolhido o número de VL, o próximo passo foi a verificação da presença de amostras anômalas. A presença desse tipo de amostra no conjunto de calibração

fornece modelos com altos valores de erro e, portanto, baixa capacidade de previsão. Nesse sentido, foi plotado o gráfico de leverage versus resíduos de Students (Figura 30). Duas amostras foram consideradas anômalas em leverage (amostra n° 13 e 14), uma vez que elas ficaram acima do valor de leverage calculado ($L = 3 \times VL/n = 3 \times 6/148 = 0,122$).

FIGURA 30 - GRÁFICO DE LEVERAGE VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS DA MATRIZ DE CALIBRAÇÃO



FONTE: o autor (2016).

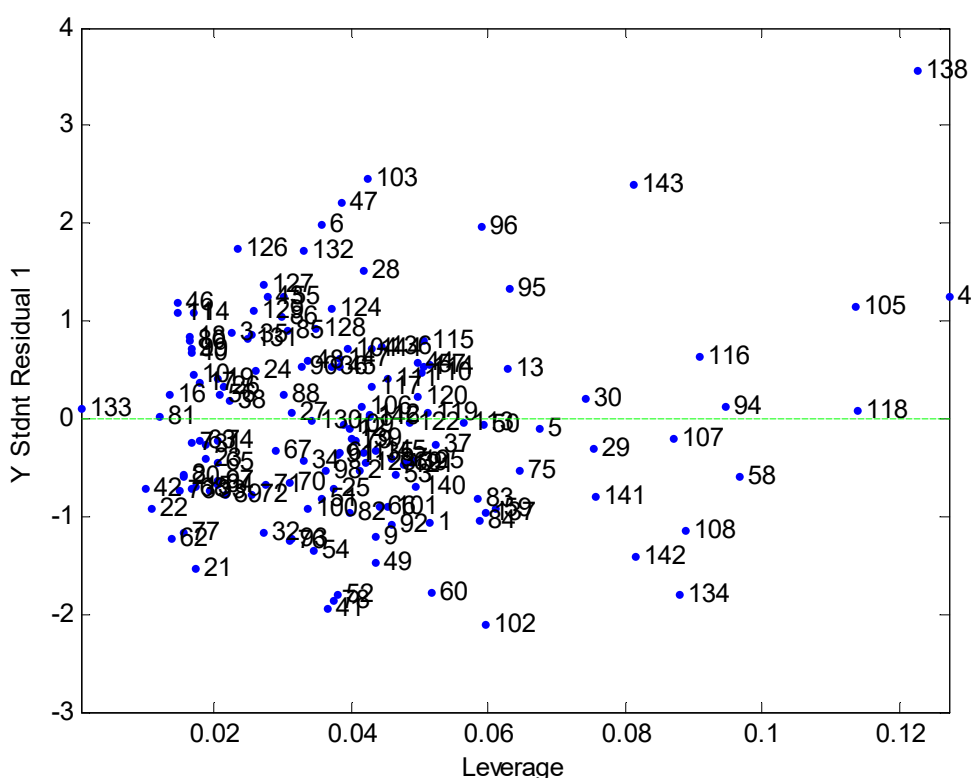
Os valores de leverage são uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Normalmente, descartam-se somente as amostras que apresentam anomalias tanto por leverage quanto por resíduo de Students, pois seria necessária uma VL para explicar cada amostra.

Considerando que os resíduos de student tem uma distribuição normal pode-se aplicar o teste t e verificar se uma amostra está ou não dentro da distribuição normal com um nível de confiança de 95%. Como os resíduos de Student são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de $\pm 2,5$ são considerados altos. Dessa forma, na análise do gráfico de resíduos Student

versus *Leverage*, deve-se verificar a influência tanto das *leverages* quanto dos "resíduos". Amostras com altos resíduos e pequenos valores de leverage provavelmente apresentam algum erro e devem ser reprocessadas. Já as amostras com altos resíduos e altas *leverages* são amostras anômalas e devem ser retiradas do modelo de calibração (BARTHUS et al., 2005).

Foi feito um novo modelo sem as amostras 13 e 14 e o gráfico de leverage por resíduo de Students mostrado na figura 31.

FIGURA 31 - GRÁFICO DE LEVERAGE VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS DA MATRIZ DE CALIBRAÇÃO SEM AS AMOSTRAS 13 E 14.



FONTE: o autor (2016).

Com a retirada das amostras 13 e 14 todas as amostras ficaram dentro do intervalo de leverage calculado ($L = 3 \times VL/n = 3 \times 6/146 = 0,123$). Em seguida, para avaliar a consistência do modelo de calibração construído, foi plotado o gráfico de valores medidos versus valores preditos (Figura 32). A análise deste gráfico foi realizada através do valor obtido para a raiz quadrada do erro médio de calibração (RMSEC). Quando valores de RMSEC são avaliados, o desejado é que este valor seja o menor possível, de preferência, menor que 1 (μm), o que indica que o modelo

modelo, bem como os erros de exatidão.

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (N = 24) TESTADO NO MODELO COM 6 VL PARA PREDIÇÃO DAS AMOSTRAS CONTROLES E COM HANSENÍASE.

Amostras	Valor real	Valor predito	ERRO	ERRO ²	RMSEP
TUBERCULÓIDE	1	1,0784	0,0784	0,006147	0,032007
	1	0,88592	-0,11408	0,013014	
	1	1,206	0,206	0,042436	
	1	0,76952	-0,23048	0,053121	
	1	0,92855	-0,07145	0,005105	
	1	0,72222	-0,27778	0,077162	
VIRCHOWIANO	1	1,1416	0,1416	0,020051	0,057808
	1	1,0715	0,0715	0,005112	
	1	1,1796	0,1796	0,032256	
	1	1,1296	0,1296	0,016796	
	1	1,2446	0,2446	0,059829	
	1	1,2021	0,2021	0,040844	
DIMORFO	1	0,87807	-0,12193	0,014867	0,049778
	1	0,89471	-0,10529	0,011086	
	1	0,85472	-0,14528	0,021106	
	1	0,79079	-0,20921	0,043769	
	1	0,96717	-0,03283	0,001078	
	1	0,84962	-0,15038	0,022614	
CONTROLE	0	0,27023	0,27023	0,073024	0,110321
	0	0,2769	0,2769	0,076674	
	0	0,074182	0,074182	0,005503	
	0	0,18129	0,18129	0,032866	
	0	0,20134	0,20134	0,040538	
	0	0,32966	0,32966	0,108676	

Fonte: o autor (2016).

Como pode ser observado, os valores de RMSEP estão dentro do desejado ($RMSEP < 1,0$) quando avaliadas as predições do grupo controle (sem diagnóstico de hanseníase) e dos grupos com diagnóstico de hanseníase.

Todas as 24 amostras foram preditas corretamente, demonstrando que o modelo criado possui uma boa consistência.

5 DISCUSSÃO

Atualmente o diagnóstico da hanseníase está baseado nos sinais clínicos que o paciente apresenta. O objetivo deste trabalho foi explorar a aplicabilidade da metabolômica para o estudo da hanseníase e encontrar biomarcadores que sejam preditivos da manifestação da doença e assim conseguir elaborar uma metodologia que seja capaz de efetuar um diagnóstico precoce, antes mesmo da manifestação dos sinais clínicos da doença.

Através da metabolômica e utilizando a Análise de componentes principais (PCA) conseguimos realizar a separação das amostras em dois grupos distintos: controles e pacientes com hanseníase.

Na tabela 6 estão as massas responsáveis pela separação do grupo com hanseníase seguido da identificação no banco de dados on-line LIPID MAPS (Universidade da Califórnia, San Diego, CA, www.lipidmaps.org).

TABELA 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS IDENTIFICADOS VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO^a

<i>m/z</i>	Classe	Subclasse
756.5551	Glicerofosfolina [GP01]	Diacilglicerofosfolina [GP0101]
701.5606	Fosfoesfingolípido [SP03]	Ceramida fosfolina (esfingomielina) [SP03]
701.5606	Fosfoesfingolípido [SP03]	Ceramida fosfoetanolamina [SP0302]
774.5659	Glicerofosfoerina [GP03]	1-álquil,2-acilglicerofosfoerina [GP0302]
774.5659	Glicerofosfoerina [GP03]	1-(1Z-alcenil),2-acilglicerofosfoerina [GP0303]
790.5606	Glicerofosfoerina [GP03]	Diacilglicerofosfoerina [GP0301]

FONTE: Fahy *et al* (2008)

^aIdentificação baseada na comparação da massa experimental no LIPID MAPS® com um erro de +/- 0.01 Daltons.

A *m/z* = 756.5551 teve 28 nomes diferentes associados conforme a tabela 7. Essas moléculas diferem somente com relação a posição das insaturações das ligações entre os carbonos.

TABELA 7 – LIPÍDIO DE $m/z=756.5551$ IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO^a

Molécula	m/z experimental	m/z teórica	Erro (ppm)	ID ^b
[PC(16:0/18:3(6Z,9Z,12Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01010598
[PC(16:0/18:3(9Z,12Z,15Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01010601
[PC(16:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01010690
[PC(14:0/20:3(8Z,11Z,14Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011374
[PC(14:1(9Z)/20:2(11Z,14Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011399
[PC(17:1(9Z)/17:2(9Z,12Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011530
[PC(17:2(9Z,12Z)/17:1(9Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011560
[PC(18:2(9Z,12Z)/16:1(9Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011620
[PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/16:0) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011646
[PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/16:0) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011677
[PC(20:2(11Z,14Z)/14:1(9Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011838
[PC(20:3(8Z,11Z,14Z)/14:0) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01011868
[PC(14:0/20:3(5Z,8Z,11Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01012127
[PC(20:3(5Z,8Z,11Z)/14:0) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP01012192
[PE(15:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010502
[PE(17:0/20:3(8Z,11Z,14Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010554
[PE(17:1(9Z)/20:2(11Z,14Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010581
[PE(17:2(9Z,12Z)/20:1(11Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010610
[PE(18:2(9Z,12Z)/19:1(9Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010668
[PE(18:3(6Z,9Z,12Z)/19:0) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010696
[PE(18:3(9Z,12Z,15Z)/19:0) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010724
[PE(19:0/18:3(6Z,9Z,12Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010777
[PE(19:0/18:3(9Z,12Z,15Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010778
[PE(19:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010806
[PE(20:1(11Z)/17:2(9Z,12Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010851
[PE(20:2(11Z,14Z)/17:1(9Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010880
[PE(20:3(8Z,11Z,14Z)/17:0) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02010910
[PE(22:2(13Z,16Z)/15:1(9Z)) + H ⁺]	756.5551	756.5538	-1.72	LMGP02011076

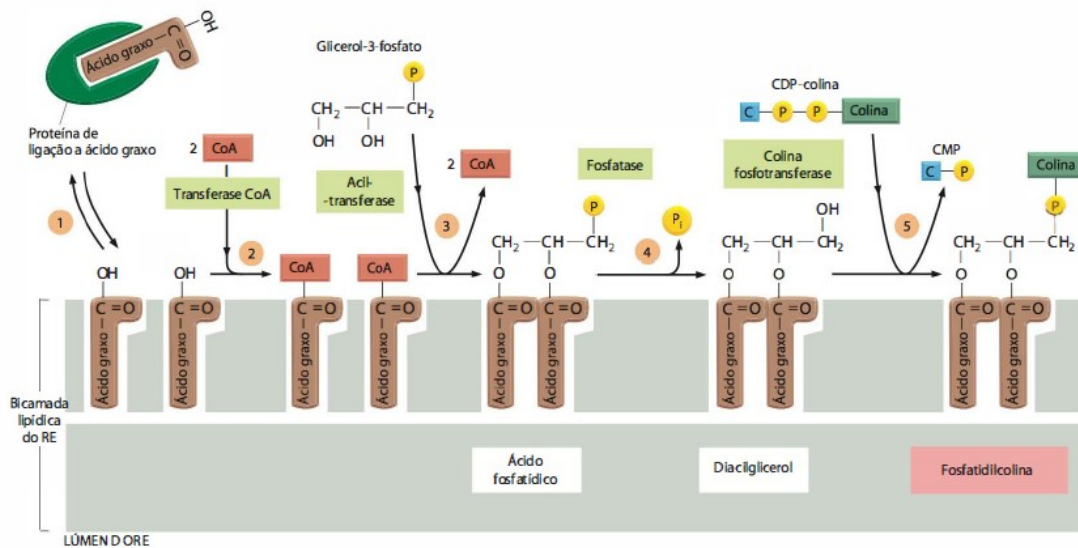
FONTE: Fahy *et al* (2008)

^aIdentificação baseada na comparação da massa experimental no LIPID MAPS® com um erro de +/- 0.01 Daltons.

^bLM = Lipid Maps.

As m/z descritas na tabela 7 pertencem a mesma classificação que é a Glicerofosfocolina (tabela 6). Essa molécula é sintetizada no retículo endoplasmático conforme a figura 33.

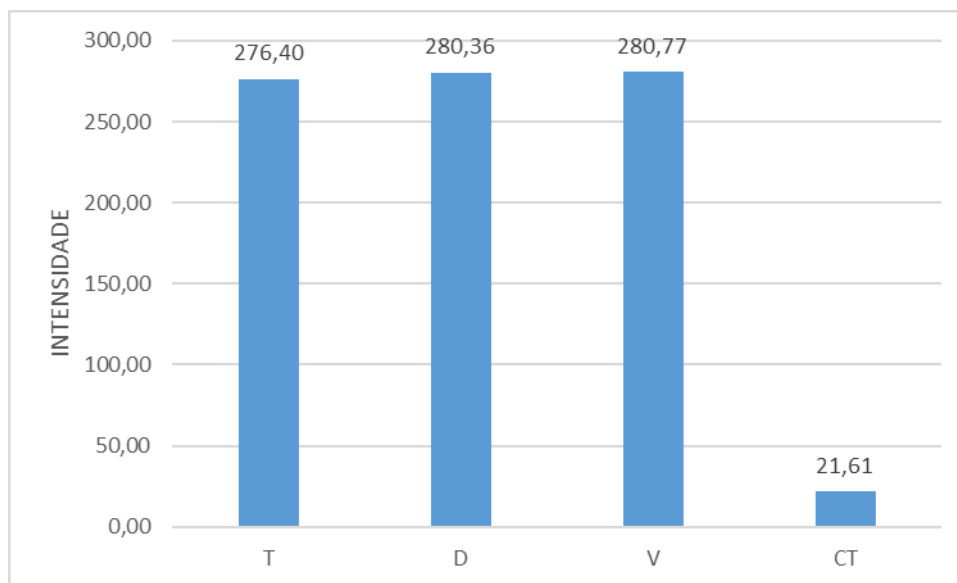
FIGURA 33 - SÍNTESE DE DIACILGLICEROFOSFOCOLINA



Fonte: Bruce (2010).

Ela é constituída de duas cadeias de ácidos graxos, cada uma ligada a uma hidroxila do glicerol. O ácido fosfórico está ligado na terceira hidroxila do glicerol e a esse fosfato está ligado o aminoácido colina. Ela é um fosfolípideo e faz parte da composição das membranas das células dos mamíferos (BRUCE, 2010).

Foi observado que a $m/z = 756.5551$ estava aumentada em mais de 13 vezes nos pacientes com hanseníase quando comparados ao grupo controle, conforme demonstrado no gráfico 1.

GRÁFICO 1 – INTENSIDADE DA $m/z=756.5551$ NOS GRUPOS

Fonte: o autor (2016).

Legenda: T (tuberculóide), D (dimorfo), V (virchowiano) e CT (controle)

A $m/z = 701.5606$ teve seis nomenclaturas diferentes possuindo a mesma massa molecular (tabela 8). Ela foi classificada como Fosfoesfingolípido e foi encontrada duas subclasses para ela: uma Ceramida fosfocolina (esfingomiéline) e a outra Ceramida fosfoetanolamina conforme a tabela 6.

TABELA 8 - LIPÍDIO DE $m/z=701.5606$ IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO^a

Molécula	m/z experimental	m/z teórica	Erro (ppm)	ID ^b
[SM(d16:1/18:1)+ H ⁺]	701.5606	701.5592	-2.00	LMSP03010040
[SM(d18:1/16:1)+H]	701.5606	701.5592	-2.00	LMSP03010041
[SM(d18:2/16:0) + H ⁺]	701.5606	701.5592	-2.00	LMSP03010090
[PE-Cer(d14:2(4E,6E)/23:0) + H ⁺]	701.5606	701.5592	-2.00	LMSP03020041
[PE-Cer(d15:2(4E,6E)/22:0) + H ⁺]	701.5606	701.5592	-2.00	LMSP03020045
[PE-Cer(d16:2(4E,6E)/21:0) + H ⁺]	701.5606	701.5592	-2.00	LMSP03020057

FONTE: Fahy *et al* (2008)

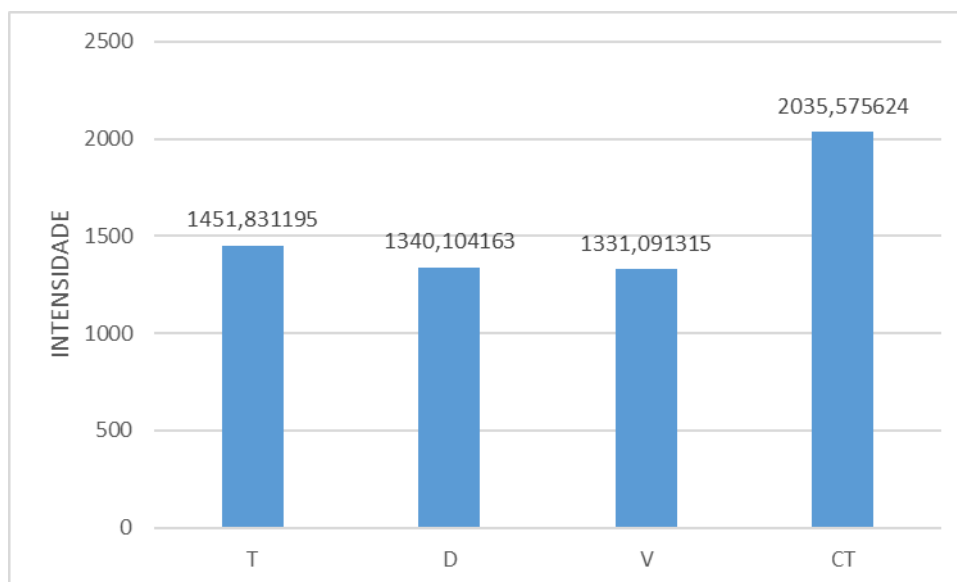
^aIdentificação baseada na comparação da massa experimental no LIPID MAPS® com um erro de +/- 0.01 Daltons.

^bLM = Lipid Maps.

A intensidade da $m/z = 701.5606$ estava aumentada no grupo controle quando

comparado aos grupos experimentais, conforme o gráfico 2.

GRÁFICO 2 – INTENSIDADE DA M/Z= 701.5606 NOS GRUPOS TUBERCULÓIDE, VIRCHOWIANO, DIMORFO E CONTROLE



Fonte: o autor, 2016

Legenda: T (tuberculóide), D (dimorfo), V (virchowiano) e CT (controle)

A ceramida fosfocolina é um esfingolípideo que também faz parte da camada bilipídica das células dos eucariotos. O esqueleto da esfingomielina é a esfingosina, um álcool aminado. Quando um ácido graxo de cadeia longa está ligado ao grupo amino da esfingosina por uma ligação amida, forma-se uma ceramida, que também pode servir como precursora dos glicolípideos. Quando a hidroxila do carbono 1 da esfingosina está esterificada pela fosforilcolina, temos a esfingomielina. A esfingomielina é um constituinte fundamental da bainha de mielina das fibras nervosas (BRUCE, 2010).

Foi relatado que a esfingomielina tem um efeito sobre o metabolismo do colesterol e, especialmente, sobre a taxa de dissociação de colesterol a partir de membranas (BARENHOLZ; THOMPSON, 1980).

Estudos também mostram que os macrófagos infectados por *Mycobacterium leprae* são induzidos a formar gotículas de colesterol. Nesse mesmo estudo os níveis de expressão de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e enzimas envolvidas na biossíntese do colesterol demonstrou ser superior na forma lepromatosa (LL) quando comparado com lesões tuberculóides limítrofe (BT) (MATTOS et al., 2014). Como a esfingomielina atua sobre o metabolismo do

colesterol e o *M. leprae* também induz a síntese de colesterol justifica que a $m/z=701.5606$ esteja aumentada no grupo controle quando comparada aos doentes, conforme observado no gráfico 2.

Como mencionado anteriormente, o metabolismo da esfingomielina está intimamente relacionado com o de colesterol e ambos estão envolvidos no processamento da proteína precursora de amiloide, sendo que metabólitos dessa proteína, regulam a homeostase do colesterol e da esfingomielina (GRIMM et al., 2005).

As esfingomielinas são degradadas pelas esfingomielinases e Samet e Barenholz em 1999 propuseram uma classificação das esfingomielinases em cinco categoria: esfingomielinase ácida (aSMase), esfingomielinase secretora (sSMase), esfingomielinases neutras dependentes de Mg^{+2} (nSMase), esfingomielinases neutros independentes de Mg^{+2} e esfingomielinase alcalina a partir do trato intestinal (SAMET; BARENHOLZ, 1999). Foi identificada uma classe de esfingomielinase presente em bactérias: a esfingomielinase bacteriana-fosfolipase C em *Listeria monocytogenes* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001), em *Staphylococcus aureus* (DOERY et al., 1965) e em *Clostridium perfringens* (TITBALL, 1993). Estes microrganismos podem utilizar fosfatidilcolina e esfingomielina como substratos, e talvez outros, bem como glicerofosfolípidos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Estas enzimas clivam esfingomielina para produzir ceramida e fosfocolina. Ceramida, por sua vez serve como um segundo mensageiro lipídico que induz uma variedade de fenômenos de regulação celular, tais como a morte celular programada (apoptose), a diferenciação celular, proliferação celular, e na homeostase de esterol (CHATTERJEE, 1999).

Ela atua no metabolismo dos esfingolipídeos sendo que há evidência de que a esfingomielinase neutra 2 dependente de Mg^{+2} (nSMase2), quando ativada, causa um aumento nos níveis de ceramida de 60% e uma diminuição nos níveis de esfingomielina em 40% (MARCHESINI et al., 2003).

A esfingomielinase neutra 3 dependente de Mg^{+2} (nSMase3) é sensível a TNF- α e sua expressão é abundante no músculo esquelético e cardíaco (KRUT et al., 2006).

O TNF- α está relacionado com a ativação das nSMase2 e nSMase3 (MARCHESINI et al., 2003) e com a indução da ciclo-oxigenase -2 (COX-2) em células epiteliais das vias respiratórias (CHEN et al., 2001). Em um estudo com

células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com Fator de necrose tumoral - α (TNF- α) descobriram que nSMase2 era a montante da sintase do óxido nítrico endotelial (PALMA, DE et al., 2006). Além disso, em hepatócitos, nSMase2 é encontrada constitutivamente na membrana plasmática, e tem implicação na ação da citocina pró-inflamatória interleucina 1 (IL-1) sobre a fosforilação de c-Jun N-terminal kinase (JNK) e de ativação (KARAKASHIAN, 2004). A JNK é um membro da família da quinase de proteína ativada por mitogénio (MAPK) que regula uma série de processos biológicos envolvidos na tumorigénese e desordens neurodegenerativas (DAVIES; TOURNIER, 2012). Como estes são vias pró-inflamatórias, isto sugere que a nSMase e, especificamente nSMase2, pode ser importante para a sinalização inflamatória induzida por TNF- α (CLARKE et al., 2007)

Considerando que a hanseníase é uma doença que leva a neuropatia do sistema nervoso periférico ela poderia ter uma correlação com a ação das esfingomielinases.

A massa $m/z=774.5659$ foi associada a 5 compostos na pesquisa no banco de dados LIPID MAPS, tabela 9, sendo sua classificação pertencente ao grupo das Glicerofosfoerina tabela 6.

TABELA 9 - LIPÍDIO DE $m/z=774.5659$ IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO^a

Molécula	m/z experimental	m/z teórica	Erro (ppm)	ID ^b
[PS(O-16:0/20:2(11Z,14Z)) + H ⁺]	774.5659	774.5643	-2.07	LMGP03020013
[PS(O-18:0/18:2(9Z,12Z)) + H ⁺]	774.5659	774.5643	-2.07	LMGP03020028
[PS(P-16:0/20:1(11Z)) + H ⁺]	774.5659	774.5643	-2.07	LMGP03030019
[PS(P-20:0/16:1(9Z)) + H ⁺]	774.5659	774.5643	-2.07	LMGP03030063
[PS(P-18:0/18:1(9Z)) + H ⁺]	774.5659	774.5643	-2.07	LMGP03030091

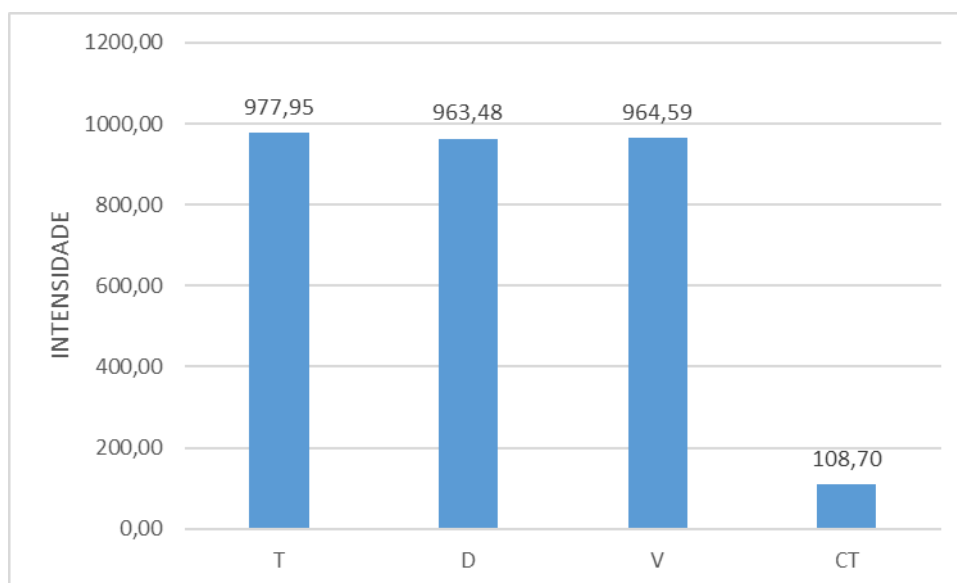
FONTE: Fahy *et al.* (2008)

^aIdentificação baseada na comparação da massa experimental no LIPID MAPS[®] com um erro de +/- 0.01 Daltons.

^bLM = Lipid Maps.

A intensidade da $m/z = 774.5659$ estava aumentada no grupo com hanseníase em aproximadamente 9 vezes quando comparada ao grupo controle conforme o gráfico 3.

GRÁFICO 3 - INTENSIDADE DA $m/z=774.5659$ NOS GRUPOS TUBERCULÓIDE, VIRCHOWIANO, DIMORFO E CONTROLE



Fonte: o autor (2016)

Legenda: T (tuberculóide), D (dimorfo), V (virchowiano) e CT (controle)

A última massa identificada foi a $m/z = 790.5606$ que na pesquisa no banco de dados LIPID MAPS sendo sua classificação pertencente ao grupo das Glicerofosfoerina (tabela 6) e foi correlacionada com 16 compostos de mesma massa descritas na tabela 10.

Tabela 10 - LIPÍDIO DE $m/z=790.5606$ IDENTIFICADO VIA UPLC-QTOF NO MODO POSITIVO^a
CONTINUA

Molécula	m/z experimental	m/z teórica	Erro (ppm)	ID ^b
[PS(18:0/18:1(9Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010025
[PS(18:1(9Z)/18:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010034
[PS(14:0/22:1(11Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010106
[PS(14:1(9Z)/22:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010134
[PS(15:1(9Z)/21:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010186
[PS(16:1(9Z)/20:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010216
[PS(17:0/19:1(9Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010238
[PS(17:1(9Z)/19:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010264
[PS(19:0/17:1(9Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010460
[PS(19:1(9Z)/17:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010488
[PS(20:0/16:1(9Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010514
[PS(20:1(11Z)/16:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010534

Molécula	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórica	Erro (ppm)	ID ^b
[PS(21:0/15:1(9Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010679
[PS(22:0/14:1(9Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010702
[PS(22:1(11Z)/14:0) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010727
[PS(16:0/20:1(11Z)) + H ⁺]	790.5606	790.5593	-1.64	LMGP03010967

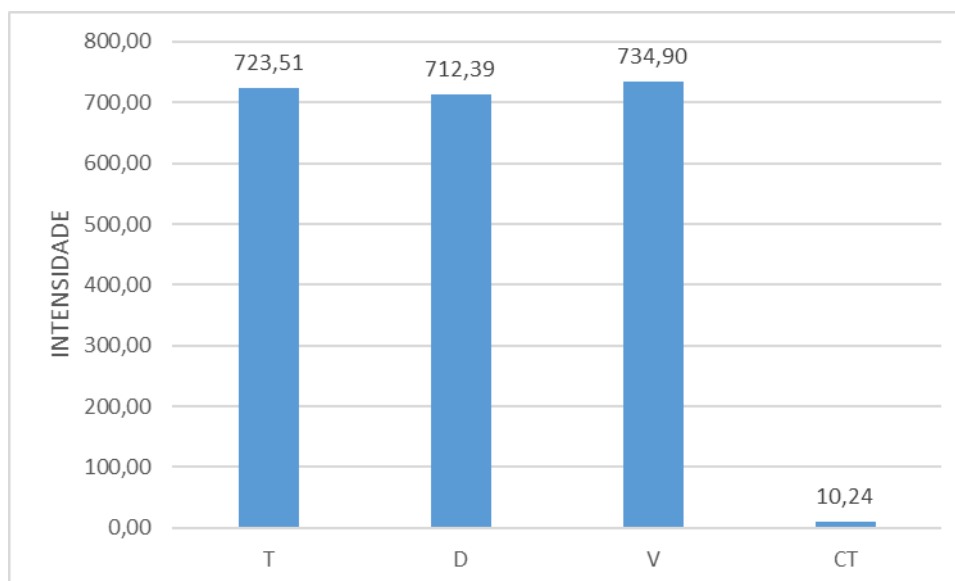
FONTE: Fahy *et al* (2008)

^aIdentificação baseada na comparação da massa experimental no LIPID MAPS® com um erro de +/- 0.01 Daltons.

^bLM = Lipid Maps.

A intensidade da $m/z = 790.5606$ estava aumentada mais de 730 vezes nos pacientes com hanseníase quando comparado com o grupo controle, conforme o gráfico 4.

GRÁFICO 4 - INTENSIDADE DA $m/z = 790.5606$ NOS GRUPOS TUBERCULÓIDE, VIRCHOWIANO, DIMORFO E CONTROLE



Fonte: o autor (2016)

Legenda: T (tuberculóide), D (dimorfo), V (virchowiano) e CT (controle)

A biossíntese de glicerofosfoserina é provavelmente o resultado da atividade da fosfolipase de tipo A / B em fosfolípidos de membrana. A fosfatidilserina está localizada exclusivamente no folheto interno da membrana plasmática (MARTIN *et al.*, 1995), o que resulta que a glicerofosfoserina deve ser liberada no citosol e transportada para fora da célula por algum transportador (PATTON-VOGT; HENRY,

1998; MARIGGIÒ et al., 2006).

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um exame bioquímico ou imunológico para o diagnóstico da hanseníase é uma necessidade para iniciar o tratamento precoce interrompendo a transmissão da doença. A dificuldade no diagnóstico desta doença, que, em seus estágios iniciais, são inespecíficos e baseados nos sinais clínicos, poderia ser facilmente substituído por um mais específico e sensível.

Utilizando a espectrometria de massas foi possível verificar a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade em diferenciar amostras de pacientes com hanseníase do grupo controle.

Com a utilização das Análises de Componentes Principais (PCA) foi possível a separação dos dados em dois conjuntos: dos pacientes com hanseníase e sem hanseníase, sendo que a responsável pela separação foi a 2 Componente Principal (CP).

As relações massas/cargas que possibilitaram a diferenciação entre pacientes os pacientes portadores de hanseníase e sadios foram as $m/z = 756.5551$, $m/z = 701.5606$, $m/z = 774.5659$ e $m/z = 790.5606$ identificadas como pertencentes a classe das Glicerofosfocolina [GP01], Fosfoesfingolipídio [SP03], Glicerofosfoserina [GP03] e Glicerofosfoserina [GP03] respectivamente.

O modelo PLS desenvolvido foi capaz de prever as 24 amostras da matriz de validação corretamente demonstrando assim que o modelo criado foi específico e sensível.

Sobre todos os aspectos apresentados, pode-se dizer que a possibilidade do diagnóstico a partir de biomarcadores sanguíneos da hanseníase, realizado de forma rápida e sem a necessidade de procedimentos mais invasivos como a baciloscopia ou biopsia de pele é bastante atrativo e promissor. Desta forma, as chances de uma intervenção medicamentosa mesmo antes dos primeiros sinais clínicos se manifestarem e o fim do ciclo de propagação da doença ajudará os países que possuem uma alta taxa de incidência da hanseníase a diminuir os custos com essa doença.

Os biomarcadores encontrados mostraram-se promissores para efetuar o diagnóstico da hanseníase no modelo criado.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J.; DAVEY, H. M.; BROADHURST, D.; et al. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 692–6, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740584>>. .

ALMEIDA, E. C.; MARTINEZ, A. N.; MANIERO, V. C.; et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 509–511, 2004.

ANDRADE, V. Implementação da PQT / OMS no Brasil. , v. 31, n. 1, p. 23–31, 2006.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373–382, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000300010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

BARENHOLZ, Y.; THOMPSON, T. E. Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 604, n. 2, p. 129–158, 1980. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273680905726>>. .

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Ecletica Química**, v. 30, n. 4, p. 51–58, 2005.

BARTON, R. P. A clinical study of the nose in lepromatous leprosy. **Leprosy review**, v. 45, n. 2, p. 135–44, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4421363>>. .

BIZUNEH, E.; BRAKEL, W. H. VAN; POOBALAN, A. S.; DECLERCQ, E. Report of the International Leprosy Association Technical Foun. 25-28 February 2002. Paris, France. Leprosy Review. **Anais...** . v. 73 Suppl, p.53–61, 2002.

BRASIL. Decreto nº 968, de 7 de maio de 1962. Baixa normas técnicas especiais para o combate à lepra no país e dá outras providências. , 1962. Disponível em:

<http://legis.senado.gov.br/legislacao/ListaNormas.action?numero=968&tipo_norma=DCM&data=19620507&link=s>. .

BRASIL, M. DA S. Controle da Hanseníase na Atenção Básica. , p. 1–86, 2001.

BRASIL, M. DA S. M. DA S. S. DE V. EM S. **Guia para o controle da hanseníase.** 2002.

BRASIL, M. DA S. M. DA S. S. DE V. EM S. D. DE V. DAS D. T. **PLANO INTEGRADO DE AÇÕES ESTRATÉGICAS DE ELIMINAÇÃO DA HANSENÍASE, FILARIOSE, ESQUISTOSSOMOSE E ONCOCERCOSE COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA, TRACOMA COMO CAUSA DE CEGUEIRA E CONTROLE DAS GEOHELMINTÍASES** Pl ano de Ação 2 0 1 1 - 2 0 1 5. 2013.

BRASIL, M. DA S. M. DA S. S. DE V. EM S. D. DE V. E. P. N. DE E. DA H. **Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010.** Brasília, 2006.

BRASIL, M. DA S. M. DA S. S. DE V. EM S. S. DE I. DE A. DE N. Casos novos de hanseníase por ano de diagnóstico. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/hanseníase/cnv/hanswuf.def>>. Acesso em: 25/10/2016.

BRASIL, M. DA S. S. N. DE L. **Manual de leprologia.** 1960.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209–1219, 2004.

BRUCE, A. ET AL. **Biologia molecular da Célula.** 2010.

BÜHRER-SÉKULA, S.; CUNHA, M. G.; FOSS, N. T.; et al. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 6, n. 4, p. 317–23, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348523>>. .

CETOLIN, S. F.; SOARES, B.; CETOLIN, S. K. Hanseníase e cidadania na política

de saúde brasileira. **Sociedade em debate**, p. 135–162, 2010. Pelotas. Disponível em: <<http://revistas.ucpel.tche.br/index.php/rsd/article/view/677>>. .

CHATTERJEE, S. Neutral sphingomyelinase: past, present and future. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 102, n. 1–2, p. 79–96, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308499000778>>. .

CHEN, C.-C.; SUN, Y.-T.; CHEN, J.-J.; CHANG, Y.-J. Tumor necrosis factor- α -induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and I κ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 3, p. 493–500, 2001. Disponível em: <internal-pdf://chen01-1039866880/chen01.pdf%5Cnhttp://molpharm.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/59/3/493>. .

CLARKE, C. J.; TRUONG, T.-G.; HANNUN, Y. A. Role for Neutral Sphingomyelinase-2 in Tumor Necrosis Factor -Stimulated Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM) in Lung Epithelial Cells: p38 MAPK IS AN UPSTREAM REGULATOR OF nSMase2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1384–1396, 2007. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M609216200>>. .

CLARO, L. L. B. **Hanseníase: representações sobre a doença**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1995.

CLAUDINO, W. M.; QUATTRONE, A.; BIGANZOLI, L.; et al. Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications. **Journal of Clinical Oncology**, 2007.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–11, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35059006>>. .

CONTRERAS MEJIA, M. D. C.; PORTO DOS SANTOS, M.; VILLAROUÇO DA SILVA, G. A.; et al. Identification of Primary Drug Resistance to Rifampin in Mycobacterium leprae Strains from Leprosy Patients in Amazonas State, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4359–4360, 2014. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01688-14>>. .

CUNHA, V. D. S. **O ISOLAMENTO COMPULSÓRIO EM QUESTÃO. POLÍTICAS DE COMBATE À LEPRA NO BRASIL (1920-1941)** Fiocruz, 2005. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ppghcs/media/tese_viviancunha.pdf>. .

DAVEY, T. F.; REES, R. J. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. **Leprosy review**, v. 45, n. 2, p. 121–34, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4608620>>. .

DAVIES, C.; TOURNIER, C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 1, p. 85–89, 2012. Disponível em: <<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST20110641>>. .

DEKKER, L. J.; BOSMAN, J.; BURGERS, P. C.; et al. Depletion of high-abundance proteins from serum by immunoaffinity chromatography: A MALDI-FT-MS study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 847, n. 1, p. 65–69, 2007.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass spectrometry reviews**, v. 26, n. 1, p. 51–78, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1904337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DOERY, H. M.; MAGNUSSON, B. J.; GULASEKHARAM, J.; PEARSON, J. E. The Properties of Phospholipase Enzymes in Staphylococcal Toxins. **Journal of General Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 283–296, 1965. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-40-2-283>>. .

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

EICHELMANN, K.; GONZÁLEZ GONZÁLEZ, S. E.; SALAS-ALANIS, J. C.; OCAMPO-CANDIANI, J. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 104, n. 7, p. 554–563, 2013. AEDV. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1578219013001431>>. .

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 590–592, 1997. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-47-2-590>>. .

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; MURPHY, R. C.; et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **The Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S9–S14, 2008. Disponível em: <<http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.R800095-JLR200>>. .

FARIA, A. R. **Hanseníase, experiências de sofrimento e vida cotidiana num ex-leprosário**, 2009.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

FRANCESCHI, P.; GIORDAN, M.; WEHRENS, R. Multiple comparisons in mass-spectrometry-based -omics technologies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 11–21, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.011>>. .

FROTA, C. C.; LIMA, L. N. C.; ROCHA, A. DA S.; et al. Mycobacterium leprae in six-banded (Euphractus sexcinctus) and nine-banded armadillos (Dasypus novemcinctus) in Northeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl, p. 209–13, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283473>>. .

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S. **bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a Mc Gra ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

GOULART, I. M. B.; BERNARDES SOUZA, D. O.; MARQUES, C. R.; et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 1, p. 101–105, 2008.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: Diagnostic and control challenges for

a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, n. 6, p. 269–290, 2008.

GOWDA, G. A. N.; ZHANG, S.; GU, H.; et al. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 8, n. 5, p. 617–33, 2008. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3890417&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GRANGE, J. M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 1S–9S, 1996. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1996.tb04592.x>>. .

GRIFFIN, J. L.; SHOCKCOR, J. P. Metabolic profiles of cancer cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. July, p. 551–561, 2004.

GRIFFITHS, W. J.; KOAL, T.; WANG, Y.; et al. Targeted metabolomics for biomarker discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2010.

GRIMM, M. O. W.; GRIMM, H. S.; PÄTZOLD, A. J.; et al. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- β and presenilin. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 1118–1123, 2005. Disponível em:
<<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb1313>>. .

HOFFMANN, C.; LEIS, A.; NIEDERWEIS, M.; PLITZKO, J. M.; ENGELHARDT, H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3963–3967, 2008. Disponível em:
<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709530105>>. .

HULSE, E. LEPROSY AND ANCIENT EGYPT. **The Lancet**, v. 300, n. 7785, p. 1024–1025, 1972. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673672924336>>. .

INGEN, J. VAN; BOEREE, M. J.; SOOLINGEN, D. VAN; et al. Are phylogenetic position, virulence, drug susceptibility and in vivo response to treatment in mycobacteria interrelated? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 832–837, 2012. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134811003613>>. .

ISSAQ, H. J.; NATIV, O.; WAYBRIGHT, T.; et al. Detection of Bladder Cancer in Human Urine by Metabolomic Profiling Using High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of Urology**, v. 179, n. 6, p. 2422–2426, 2008.

ISSAQ, H. J.; VAN, Q. N.; WAYBRIGHT, T. J.; MUSCHIK, G. M.; VEENSTRA, T. D. Analytical and statistical approaches to metabolomics research. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 13, p. 2183–2199, 2009.

JOB, C. K.; JAYAKUMAR, J.; KEARNEY, M.; GILLIS, T. P. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518–21, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337353>>. .

KARAKASHIAN, A. A. Expression of neutral sphingomyelinase-2 (NSMase-2) in primary rat hepatocytes modulates IL- -induced JNK activation. **The FASEB Journal**, v. 2, p. 1–23, 2004. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.03-0875fje>>. .

KIM, B. J.; LEE, S. H.; LYU, M. A.; et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1714–20, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325313>>. .

KIND, T.; TOLSTIKOV, V.; FIEHN, O.; WEISS, R. H. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 2, p. 185–195, 2007.

KLATSER, P. R.; BEERS, S. VAN; MADJID, B.; DAY, R.; WIT, M. Y. DE. Detection of Mycobacterium leprae nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2947–51, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8263180>>. .

KRUT, O.; WIEGMANN, K.; KASHKAR, H.; YAZDANPANA, B.; KRÖNKE, M. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13784–13793, 2006.

LANGUILLON, J.; CARAYON, A. **Lésions cutanées**. 2^o, MASSO ed. Paris: Précis de léprologie, 1986.

LASTÓRIA, J.; ABREU, M. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, v. 17, n. 4, p. 5–8, 2012. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3329.pdf>>. .

LAVANIA, M.; KATOCH, K.; KATOCH, V. M.; et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 627–631, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134808001226>>. .

LIKOVSKÝ, J.; URBANOVÁ, M.; HÁJEK, M.; ČERNÝ, V.; ČECH, P. Two cases of leprosy from Žatec (Bohemia), dated to the turn of the 12th century and confirmed by DNA analysis for *Mycobacterium leprae*. **Journal of Archaeological Science**, v. 33, n. 9, p. 1276–1283, 2006.

LIN, C. Y.; VIANT, M. R.; TJEERDEMA, R. S. Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. **Journal of Pesticide Science**, 2006.

LIN, L.; YU, Q.; YAN, X.; et al. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabolomics? A serum metabolomic study of kidney cancer. **The Analyst**, v. 135, n. 11, p. 2970–2978, 2010.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Metabonomics in pharmaceutical R&D. **The FEBS journal**, v. 274, n. 5, p. 1140–51, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21083101>>. .

LOKHOV, P. G.; KHARYBIN, O. N.; ARCHAKOV, A. I. International Journal of Mass Spectrometry Diagnosis of lung cancer based on direct-infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 309, p. 200–205, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2011.10.002>>. .

LUQUE-GARCIA, J. L.; NEUBERT, T. A. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2007.

MACHADO, K. **Meta é erradicar a doença até 2005. Vai ser possível?** Rio de Janeiro, 2004.

MARCHESINI, N.; LUBERTO, C.; HANNUN, Y. A. Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase2 and its role in sphingolipid metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 13775–13783, 2003.

MARIGGIÒ, S.; IURISCI, C.; SEBASTIÀ, J.; PATTON-VOGT, J.; CORDA, D. Molecular characterization of a glycerophosphoinositol transporter in mammalian cells. **FEBS letters**, v. 580, n. 30, p. 6789–96, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141226>>. .

MARIOTTI, V.; DUTOIR, O.; BELCASTRO, M. G.; FACCHINI, F.; BRASILI, P. Probable early presence of leprosy in Europe in a Celtic skeleton of the 4th-3rd century BC (Casalecchio di Reno, Bologna, Italy). **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 15, n. 5, p. 311–325, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/oa.775>>. .

MARRIOTT, J. B.; MULLER, G.; DALGLEISH, A. G. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. **Immunology today**, v. 20, n. 12, p. 538–40, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562702>>. .

MARTIN, S. J.; REUTELINGSPERGER, C. P.; MCGAHON, A. J.; et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1545–56, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595224>>. .

MARTINS, P. V.; CAPONI, S. Hanseníase, exclusão e preconceito: histórias de vida de mulheres em Santa Catarina. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1047–1054, 2010.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FIHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA*, M. A. Z. Análise Exploratória Em Química Analítica Com Emprego De Quimiometria : Pca e Pca de Imagens. **Revista Analytica**, v. 6, p. 38–50, 2003.

MATTOS, K. A.; OLIVEIRA, V. C. G.; BERRÊDO-PINHO, M.; et al. Mycobacterium

leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 797–815, 2014.

MOCO, S.; VERVOORT, J.; MOCO, S.; et al. Metabolomics technologies and metabolite identification. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 855–866, 2007.

MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; et al. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040–1042, 2005.

MOREIRA, A. Panorama sobre a hanseníase: quadro atual e perspectivas. **História, Ciências, Saúde**, v. 10, n. supplement 1, p. 291–307, 2003.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 417–426, 2004.

NG, V.; ZANAZZI, G.; TIMPL, R.; et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511–24, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081637>>. .

NOGUEIRA, W.; MARZLIAK, M. L. C. Perspectivas da eliminação da hanseníase no estado de são paulo e no brasil. **Medicina**, v. 30, n. 3, p. 364–370, 1997. Ribeirão Preto. Disponível em: <<http://revistas.usp.br/rmrp/article/view/6506/7977>>. .

NOORDEEN, S. K. Elimination of leprosy as a public health problem. **Indian journal of leprosy**, v. 66, n. 1, p. 1–10, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983387>>. .

ORNELLAS, C. P. **Paciente Excluído: História e Crítica das Práticas Médicas de Confinamento**. Rio de Janeiro: Revan, 1997.

PALMA, C. DE; MEACCI, E.; PERROTTA, C.; BRUNI, P.; CLEMENTI, E. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor ?? through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: A novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 1, p. 99–105, 2006.

PATTON-VOGT, J. L.; HENRY, S. A. GIT1, a gene encoding a novel transporter for glycerophosphoinositol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 149, n. 4, p. 1707–15, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9691030>>. .

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of Leprosy According to Immunity. **International Journal of Leprosy**, 1962.

RITCHIE, S. A.; AHIAHONU, P. W. K.; JAYASINGHE, D.; et al. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: implications for early screening and detection. **BMC medicine**, v. 8, p. 13, 2010.

ROBBINS, G.; MUSHRIF TRIPATHY, V.; MISRA, V. N.; et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. 1–8, 2009.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 464–470, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70006-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70006-8)>. .

RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 23, p. 7954–7958, 2006.

SAMET, D.; BARENHOLZ, Y. Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 102, n. 1–2, p. 65–77, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308499000766>>. .

SCHERR, N.; NGUYEN, L. Mycobacterium versus Streptomyces—we are different, we are the same. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 699–707, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527409001532>>. .

SCHNEIDER, S. D. Lepra: representações da doença e dos doentes através de discursos médico-científicos e governamentais. IV Congresso Internacional de História. **Anais...**, 2009. Programa de Pós-Graduação em História e Departamento de História - Universidade Estadual de Maringá - UEM. Disponível em: <<http://www.pph.uem.br/cih/anais/trabalho.php?tid=592>>. .

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; et al. The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006>>. .

SHEPARD, C. C. Chemotherapy of Leprosy. **Annual Review of Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 37–50, 1969. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pa.09.040169.000345>>. .

SOUZA, C. S. Hanseníase : Formas Clínicas E. **Revista de Medicina, Ribeirão Preto**, p. 325–334, 1997.

STEFANI, M. M. D. A. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41 Suppl 2, n. Suplemento II, p. 89–94, 2008.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, 2003.

TAYLOR, G. M.; WIDDISON, S.; BROWN, I. N.; YOUNG, D.; MOLLESON, T. A Mediaeval Case of Lepromatous Leprosy from 13–14th Century Orkney, Scotland. **Journal of Archaeological Science**, v. 27, n. 12, p. 1133–1138, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305440399905320>>. .

TITBALL, R. W. Bacterial phospholipases C. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 347–366, 1993. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/content/57/2/347.full.pdf>>. .

TRUMAN, R. W.; SINGH, P.; SHARMA, R.; et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 17, p. 1626–1633, 2011. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1010536>>. .

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, 2007.

URAYAMA, S.; ZOU, W.; BROOKS, K.; TOLSTIKOV, V. Comprehensive mass

spectrometry based metabolic profiling of blood plasma reveals potent discriminatory classifiers of pancreatic cancer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 5, p. 613–620, 2010.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; et al. Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>>. .

VEENSTRA, T. D.; CONRADS, T. P.; HOOD, B. L.; et al. Biomarkers: mining the biofluid proteome. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 4, n. 4, p. 409–418, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, 2005.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. **Genome biology**, v. 2, n. 8, p. REVIEWS1023, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532219>>. .

WANT, E. J.; MAILLE, G. O.; SMITH, C. A.; et al. Clustering , and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 78, n. 3, p. 743–752, 2006.

WEN, Y.; XING, Y.; YUAN, L.-C.; et al. Whole-Blood Nested-PCR Amplification of M. leprae-Specific DNA for Early Diagnosis of Leprosy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 918–922, 2013. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.11-0253>>. .

WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **World Health Organization**, v. 87, n. 34, p. 317–328, 2012.

WHO. Cluster analysis of the overall detection rate of leprosy in Brazil for the triennium 2011 2013. Disponível em: <http://www.who.int/lep/resources/Cluster_analysis/en/>. Acesso em: 20/4/2015.

WHO. Cluster analysis of the overall detection rate of leprosy in Brazil for the

triennium 2011-2013. Disponível em:

<http://www.who.int/lep/resources/Cluster_analysis/en/>. Acesso em: 4/4/2016.

WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; et al. HMDB: A knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 603–610, 2009.

YAP, I. Why Metabonomics? **Imu.Edu.My**, v. 5, n. 1, p. 17–26, 2011. Disponível em: <http://www.imu.edu.my/ejournal/approved/4.Review_Ivan_p17-26.pdf>. .

ZHANG, X.; WEI, D.; YAP, Y.; et al. Mass spectrometry-based “omics” technologies in cancer diagnostics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 3, p. 403–431, 2007.

ZUBER, B.; CHAMI, M.; HOUSSIN, C.; et al. Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 16, p. 5672–5680, 2008. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01919-07>>. .